COLLECTED REPRINTS

1961

FROM THE TOKAI REGIONAL
FISHERIES RESEARCH LABORATORY

東海区水産研究所業績集

昭和36年度

LIBRARY
FEB 25 1963
FISH & WILDLIFE SERVICE

東海区水産研究所
東京都中央区月島3号地
昭和37年4月

この業績集は東海区水産研究所研究報告以外の学術刊行物に発表された業績の集録である。

The present volume consists of reprints from scientific publications other than the Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory.

東海区水産研究所業績集

昭和36年度

目　　次

資　　源

業績番号

林　繁一・田所　瑛　(B-360)
日本近海におけるタイワンアイノコ，*Stolephorus zollingeri* (BLEEKER) の出現について（英文）

林　繁一・田所　瑛　(B-361)
カタクチイワシ漁場におけるタイワンアイノコの漁獲量

近藤恵一　(B-362)
1958年東海区および東北海区における沿岸資源の漁況と魚価の関係

長崎福三　(B-365)
おつとせい群の量的研究（英文）

増　　殖

戸沢晴巳・相良順一郎　(B-352)
二枚貝のビタミン B_{12} 代謝について—I. 人工海水に添加した放射性 B_{12} のアサリによる吸収

戸沢晴巳・相良順一郎　(B-353)
二枚貝のビタミン B_{12} 代謝について—II. アサリの体内および人工海水中での放射性 B_{12} の安定性

水産化学及び利用

右田正男・大竹茂夫　(B-343)
致死条件が魚肉蛋白におよぼす影響—II. 即殺および苦悶死コイ肉蛋白の凍結による変化

右田正男・鈴木たね子　(B-354)
致死条件が魚肉蛋白におよぼす影響—III. ミオシン区蛋白の粘度にみられる相異

鈴木たね子・右田正男　(B-359)
魚の死後経過にともなうミオシン区蛋白の変性—I. 魚種および致死条件が溶出性，塩析域，および粘度の変化におよぼす影響

岡田　稔・中山正夫　(B-342)
水産ねり製品の足に対する酸化剤の増強効果

衣巻豊輔 (B-339)
天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究—XI. ビタミン濃縮物のエステル化（其の 3）フタル酸類のジビタミンAエステル
衣巻豊輔 (B-340)
天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究—XII. ビタミンA濃縮物のエステル化（其の 4）フタル酸類のモノビタミンAエステル
衣巻豊輔 (B-341)
天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究—XIII. ビタミンA濃縮物のエステル化（其の 5）フタル酸類のモノビタミンAエステルの性状
平尾秀一・菊地　嶺 (B-356)
$SbCl_3$–$CHCl_3$ 試薬によるコレステロールの発色の吟味
東　秀雄・山川健重・衣巻豊輔・杉井麒三郎・岩崎喜久子 (B-357)
ビタミンDの定量法および水産物中のビタミンD含量
秋谷年見・石井清之助・酒井寿江・荒井君枝 (B-358)
油脂の加熱による性状の変化と栄養価の変化（第2報）
新間弥一郎・田口脩子 (B-344)
イシナギ肝臓を原因食とする中毒症状の観察
新間弥一郎・田口脩子 (B-363)
天然ニジマスの脂質について
内山　均・天野慶之 (B-345)
ホウ酸の水産ねり製品への不正使用状況について

TABLE OF CONTENTS

MARINE RESOURCES

Contribution Number

HAYASHI, S. and TADOKORO, A. (B-360)
Occurrence of the Taiwan-ainoko, *Stolephorus zollingeri* (BLEEKER), in Japan.

HAYASHI, S. and TADOKORO, A. (B-361)
Catch of the Taiwan-ainoko in the anchovy fishing area around Japan.

KONDO, K. (B-362)
Studies on relationships between amount and price of the marine fish catch from the Pacific coast of Honshu in 1958.

NAGASAKI, F. (B-365)
Population study on the fur seal herd.

AQUICULTURE

TOZAWA, H. and SAGARA, J. (B-352)
On the vitamin B_{12} metabolism on bivalves—I. Absorption of radioactive vitamin B_{12} from environmental sea water by *Tapes japonica*.

TOZAWA, H. and SAGARA, J. (B-353)
On the vitamin B_{12} metabolism on bivalves—II. Stability of radioactive vitamin B_{12} in tissues of *Tapes japonica* and in artificial sea water.

MARINE PRODUCT UTILIZATION AND CHEMISTRY

MIGITA, M. and OTAKE, S. (B-343)
Influence of different lethal conditions upon fish muscle protein—II.

MIGITA, M. and SUZUKI, T. (B-354)
Influence of different lethal conditions upon fish muscle protein—III. Variation in viscosity of myosins extracted from fishes killed in different ways.

SUZUKI, T. and MIGITA, M. (B-359)
Post-mortem change of fish myosins—I. Some physicochemical changes with special reference to species and lethal conditions of fish.

OKADA, M. and NAKAYAMA, M. (B-342)
The effect of oxidants on jelly strength of Kamaboko.

KINUMAKI, T. (B-339)
Studies on the economical manufacture of vitamin A concentrate from fish liver oil—XI. Esterification of vitamin A concentrate.
3. Divitamin A esters of phthalic acids.

KINUMAKI, T. (B-340)
Studies on the economical manufacture of vitamin A concentrate from fish liver oil—XII. Esterification of vitamin A concentrate.
4. Monovitamin A esters of phthalic acids.

KINUMAKI, T. (B-341)
Studies on the economical manufacture of vitamin A concentrate from fish liver oil—XIII. Esterification of vitamin A concentrate.
5. Properties of monovitamin A esters of phthalic acids.

HIRAO, S. and KIKUCHI, R. (B-356)
Coloration of cholesterol with $SbCl_3$–$CHCl_3$ reagent.

HIGASHI, H., YAMAKAWA, T., KINUMAKI, T., SUGII, K. and IWASAKI, K. (B-357)
Determination of vitamin D in fish and fish products by chromatography with Japanese acid clay.

AKIYA, T., ISHII, S., SAKAI, H. and ARAI, K. (B-358)
Studies on characteristic and nutritive changes of oils during heating. (Part 2)

SHIMMA, Y. and TAGUCHI, H. (B-344)
A symptomatic observation of the intoxication caused by liver of "Ishinagi" (*Stereolepsis ishinagi*)

SHIMMA, Y. and TAGUCHI, H. (B-363)
Studies on lipids of wild rainbow trout.

UCHIYAMA, H. and AMANO, K. (B-345)
Examination of boric acid illegally added to fish jelly products.

OCCURRENCE OF THE *TAIWAN-AINOKO, STOLEPHORUS ZOLLINGERI* (BLEEKER), IN JAPAN

Shigeichi HAYASHI and Akira TADOKORO

日本水産学会誌
第二十八巻 第一号 別冊
昭和三十七年一月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 28, No. 1, January 1962

OCCURRENCE OF THE *TAIWAN-AINOKO, STOLEPHORUS ZOLLINGERI* (BLEEKER), IN JAPAN*

Shigeichi HAYASHI** and Akira TADOKORO***

(Rceived Oct. 30, 1961)

Introduction

While it is axiomatic that almost all the anchovy catch in Japan consists of a single species, "*katakuchi-iwashi*", *Engraulis japonica* (HOUTTUYN), a few minor species of Stolephorinae have been occasionally reported. In the preliminary research on the Japan's fisheries, it was found that *E. japonica* was replaced by another engraulid fish called "*mizushuren*" or "*mizuesu*", an unknown species of *Engraulis*, in the waters adjacent to or south of the Amami Ôshima (Agriculture Bureau[1),2)]). The latter species was sometimes found in the southern part of Kyûshû. KISHINOUYE[8)] (p. 110) also observed that *mizushuren* was distributed in the Ryûkyû Islands where he could not find *E. japonica*. He, also, did not indicate the specific name of the former.

Recently KAMOHARA[6)] erroneously reported *Stolephorus pseudoheteroloba* (HARDENBERG) from the Kôchi Prefecture and gave the species a Japanese standard common name, "*ohaguro-katakuchi*". Later he[7)] corrected speciation of this fish "*indo-ainoko*", *S. indicus* (van HASSELT)****. HERRE[5)] (p. 80), also, stated that *S. indicus* was distributed as far north as Japan.

While working in the nation-wide investigations since 1949, YOKOTA and ASAMI (personal communication) of the Nankai Regional Fisheries Research Laboratory occasionally noticed an unknown species in the anchovy catch on the easterm coast of Kyûshû. The same species was again found anong postlarval anchovy from several localities along Japan. Further examination of the specimens lead us to the conclusion that it was *taiwan-ainoko, Stolephorus zollingeri* (BLEEKER), now from this evidence, also occasionally distributed in the southern part of Japan.

We wish to express our heartfelt acknowledgements for the instruction and cooperation given us by many persons, without which this study was impossible. Dr. Zinzirô NAKAI, Tôkai Regional Fisheries Research Laboratory, gave us kind advice as well as the chance to conduct this study. We have also grateful for the advice of Dr. Kiyomatsu MATSUBARA, Dr. Akira OCHIAI and Dr. Fumio MITANI of the Kyôto University, and Dr. Itsuo KUBO of the Tôkyô University of Fisheries. Mr. Takio

* Contribution B No. 360 from Tôkai Regional Fisheries Research Laboratory, Tôkyô.

** Tôkai Regional Fisheries Research Laboratory (林繁一, 東海区水産研究所).

*** Fuji Pearl Co., Inc. (田所瑛, 富士真珠株式会社).

**** Although several authors including FOWLER[3)] and KAMOHARA[6),7)] used the generic name, *Anchoviella*, instead of *Stolephorus* for these two species, we adopted the latter according to MATSUBARA[9)].

Yokota and Mr. Tadahiko Asami of the Nankai Regional Fisheries Research Laboratory and Dr. Tokiharu Abe of the Tôkai Regional Fisheries Research Laboratory gave us valuable suggestions in addition to giving us specimens for the study. Thanks are also due to Mr. Teruhiko Kusakabe and Mr. Hideo Umehara of the Tôkai Regional Fisheries Research Laboratory for their assistance in identifying and preparing the materials. Finally, our thanks go to Dr. Elbert H. Ahlstrom and Mr. David Kramer of the La Jolla Biological Laboratory, who carefully read the manuscript.

Material

The present study is based on three samples, each comprising 20 specimens or more. The first sample consists of grown fish, 55–75 mm in standard length, caught by *pacchi-ami* (a kind of boat seine of drawer type) at the estuary of the River Okita, Miyazaki Prefecture, on July 25, 1958. The second sample that comprised of post-larvae, 23–38 mm in standard length, was provided from the catch by a *shirasu-ami* (a kind of boat seine) that was operated near beach of Totoro, Miyazaki Prefecture, on February 20, 1959. The third sample with the adults, 55–80 mm in standard length, from the Shizuoka Prefectural Fisheries Experimental Station, was given to us by Dr. T. Abe of the Tôkai Regional Fisheries Research Laboratory.

Description

Head 4.18–4.56, depth 5.67–6.52 in standard length. Snout 4.52–5.52, horizontal diameter of eye 3.45–3.77 in head. Dorsal fin 12–15; anal fin 12–15 vertebrae including urostyle 41–44 (24 or 25+17–19); abdominal scutes 6 or 7.

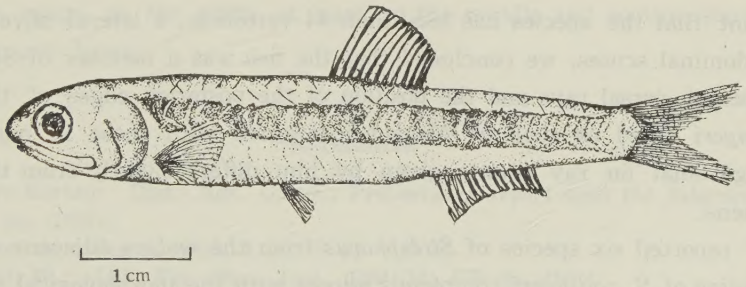


Fig. 1. Adult of *Stolephorus zollingeri*, 63 mm in standard length, caught at estuary of the River Okita, Miyazaki Prefecture, on 25 July 1958.

Body elongate, moderately compressed. Snout blunt, slightly projecting foreward. Mouth very large, maxillary reaching mid-point between the posterior edge of eye and opercle, and does not extend preopercle. Colour in formalin brown above grayish-white below, a longitudinal dark brown band (possibly silver in life) on mid-lateral side. Dorsal and caudal fins spotted with black (Fig. 1). Nearly matured ova elliptic in shape, maximum in present study 0.6 mm×0.3 mm (Fig. 2).

The postlarva of this species resembles to that of *Engraulis japonica* (Fig. 3). These two species are clearly distinguished from each other when they exceed 26 mm in standard length (HAYASHI and TADOKORO[4]).

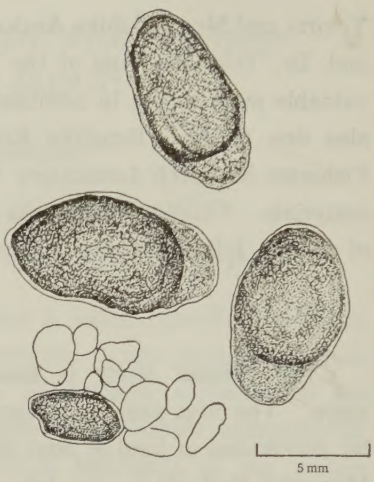


Fig. 2. Ova taken from the adult, shown in Fig. 1.

Discussion

MATSUBARA[9] divided Engraulidae into three Subfamilies Stolephorinae, Thrissinae and Coilinae. According to him, the present species should be referred to Stolephorinae, because of the facts that the body is elongate moderately, the abdominal vertebrae are more numerous than caudal ones, and matured ova are elliptic in shape. Taking it into account that the species has less than 44 vertebrae, a lateral silvery band and several abdominal scutes, we concluded that the fish was a member of Stolephorinae. The number of dorsal rays and the position of the posterior edges of the maxillary in *S. zollingeri* listed as such by MATSUBARA[9] agree with those in our specimens, even though anal fin ray counts given by him differs slightly from the counts of the specimens.

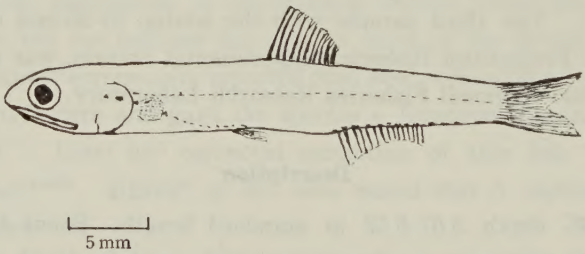


Fig. 3. Postlarva of *Stelephorus zollingeri*, 34 mm in total length, caught near Totoro, Miyazaki Prefecture, on 20 February, 1959.

SHEN[10] reported six species of *Stolephorus* from the waters adjacent to Formosa. His description of *S. zollingeri* completely agrees with the morphological characters of our specimens.

FOWLER[3], in his taxonomic study of the fishes from Philippines, listed 14 species of *Stolephorus** in five groups in the category of anal fin ray counts. Our specimens were the same as his *S. zollingeri* in all respect except in anal fin ray counts.

Even though anal ray counts of *S. zollingeri* differ slightly depending upon the investigator shown above, it is most probable that our specimens belong to this

* See footnote of p. 26.

particular species since they agree completely with the description by SHEN[10] and fairly well with the one by MATSUBARA[9] above.

In this connection, it should be taken into account that the characters (15 dorsal rays and 16 anal rays) of *S. indicus*, from the Kôchi Prefecture, identified as such by KAMOHARA[6),7)] coincide with those of *S. zollingeri* listed by MATSUBARA[9]. Although KAMOHARA's description on this rare anchovy was not sufficient to permit any further discussion, the above facts suggests that Shikoku is also included in the distribution range of *S. zollingeri*.

The occurrence of *S. zollingeri* in Formosa and Japan suggests that the anchovy, called *mizushuren* (Agriculture Bureau[1),2)], KISHINOUYE[8)]), also might be the species under discussion. In fact, a rather sketchy illustration of *mizushuren* from Amami Ôshima (Agriculture Bureau[1)], Fig. 15), resembles this species in shape of the head and the lateral colour band. Not only morphological similarity but also ecological resemblance is suggested between *mizushuren* and *S. zollingeri*. Namely, the remarkable annual fluctuation in the *mizushuren* stock in the coastal waters of the southern islands (Agriculture Bureau[1),2)]) seems to coincide with the suggested fluctuation in the stodk of *S. zollingeri* on the Pacific coast of the Wakayama Prefecture; in that the fish could not be found there in the spring of 1958 but appeared rather frequently in the spring of 1959 (HAYASHI and TADOKORO[4)]).

Conclusion

The *taiwan-ainoko*, *Stolephorus zollingeri* (BLEEKER), was reported from the tropical and subtropical localities of the Far East, including Formosa, the Philippines, East India and Polynesia (FOWLER[3)], HERRE[5)], MATSUBARA[9)], SHEN[10)]). The present study has extended the range as far north, at least, to the middle and southwestern parts of the waters around Japan.

References

1) Agriculture Bureau: Dept. Agr. Comm., *Preliminary report upon the fisheries of Japan*, **1** (1), 103 pp. (1891a).
2) ——: Dept. Agr. Comm., *ibid.*, **1** (2), 51 pp. (1891b).
3) FOWLER, H. W.: *U.S. Nat. Mus., Bull.*, **100** (13), 979 pp. (1941).
4) HAYASHI, S. and A. TADOKORO: *Japan. Soc. Sci. Fisher., Bull.*, **28** 26-29 (1962).
5) HERRE, A. W.: *U. S. Fish and Wildl. Serv., Res. Report.*, (20), 977 pp. (1953).
6) KAMOHARA, T.: *Kôchi Univ., Rept., Nat. Sci.*, **2** (2), 10 pp. (1952).
7) ——: *Usa Mar. Biol. St. Rept.*, **5** (1), 1-76 (1958).
8) KISHINOUYE, K.: *Jour. Fisher. Bur.*, **14** (3), 71-110 (1908).
9) MATSUBARA, K.: *Fish morphology and hierarchy, Part I*, 789 pp. Ishizaki Shoten, Tôkyô.
10) SHEN, S.: *Inst. Fisher. Biol., Min. Econ. Aff. Nat. Taiwan Univ.*, **1** (3), 24-37 (1959).

カタクチイワシ漁場におけるタイワンアイノコの漁獲量

林　繁一・田所瑛

日本水産学会誌
第二十八巻 第一号 別冊
昭和三十七年一月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 28, No. 1, January 1962.

カタクチイワシ漁場におけるタイワンアイノコの漁獲量

林　繁一・田所　瑛

(1961 年 10 月 30 日受理)

CATCH OF THE *TAIWAN'AINOKO* IN THE ANCHOVY FISHING AREA AROUND JAPAN

Shigeichi HAYASHI* and Akira TADOKORO**

The *taiwa'ainoko, Stolephorus zollingeri* (BLEEKER) was distributed in the waters around and south of middle Japan. The species was mainly found in the areas under the influence of the Kuroshio Current. A few specimens were also collected in the Suruga Bay, Enshû Nada and western part of the Seto Inland Sea. This fish is a rare anchovy, but still seems to show itself as an indicator species representing the environmental conditions of the important neritic-pelagic fishes.

日本近海にタイワンアイノコ, *Stolephorus zollingeri* (BLEEKER), が分布することはさきに報告した (HAYASHI and TADOKORO[4])。本報では主としてシラス漁場における本種の混獲状況について述べる。

本文に入るに先立ち，研究の機会を与えられた東海区水産研究所資源部中井甚二郎部長，標本の査定を煩わした元同部員日下部輝彦，梅原秀男両氏に感謝する。なお，本研究に用いた標本は茨城県水産試験場原田和民，静岡県水産試験場浜名湖分場角皆英明，愛知県水産試験場堀淳，和歌山県水産試験場鈴木猛，南海区水産研究所浅見忠彦，西海区水産研究所半田邦甫，山口県内海水産試験場木幡孜の諸氏により採集されたことを記し，深謝の意を表する。

材　　料

本研究には主として 1958 年 4 月から 1959 年 4 月の間に，茨城県以南山口県瀬戸内海沿岸にいたる日本南西水域で得られたシラス標本を用いた。同標本はカタクチイワシの体節的変異を知る目的で集められたものである (HAYASHI[3])。このほかカタクチイワシと比較するために，1959 年 8 月 29 日に静岡県静浦地先で漁獲された個体を観察した (HAYASHI and TADOKORO[4])。

各発育段階におけるカタクチイワシとタイワンアイノコの形態上の差異

体長 14mm に達したタイワンアイノコとカタクチイワシとは体節的形質によつて区別される。一例として 1958 年 7~12 月に和歌山県下で採集された標本についてみると，タイワンアイノコの脊椎骨数，背・臀鰭条数はカタクチイワシのそれよりも並数において 2 または 3 個少なく，しかも両者の分布はほとんど重なり合わない (Table 1)。体長 30mm 前後になると，両種は吻端の形で容易に区別される。すなわち，タイワンアイノコの吻は短かくて，その先端は丸味をおびるが，カタクチイワシのそれはやや長くて，眼径よりわずかに短かく，先端部も多少とも尖る (Fig. 1)。このほか体長 40mm を超えると吻の形のみでなく

東海区水産研究所業績 B 第 361 号

* 東海区水産研究所 (Tôkai Regional Fisheries Research Laboratory, Tsukishima, Chuo-ku, Tokyo).
** 富士真珠株式会社 (Fuji Pearl Co. Inc. Hamajimacho Mie Pref.).

Table 1. Numbers of vertebrae, dorsal and anal fin rays of specimens of *Stolephorus zollingeri* and *Engraulis japonica* taken from the Wakayama Prefecture during July through December, 1958.

Vertebral counts (including urostyle);

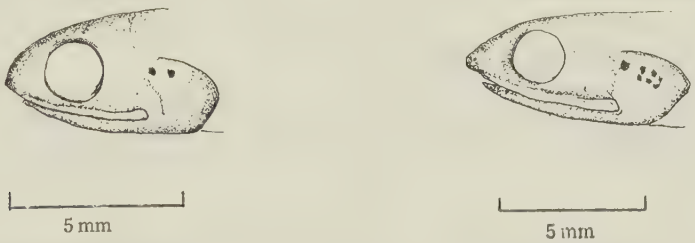
	Number of specimens	41	42	43	44	45	46	47
E. japonica	800	—	—	—	60	574	165	1
S. zollingeri	127	6	60	59	2	—	—	—

Dorsal ray counts;

	Number of specimens	12	13	14	15	16	17
E. japonica	800	—	—	164	586	68	2
S. zollingeri	127	1	57	67	2	—	—

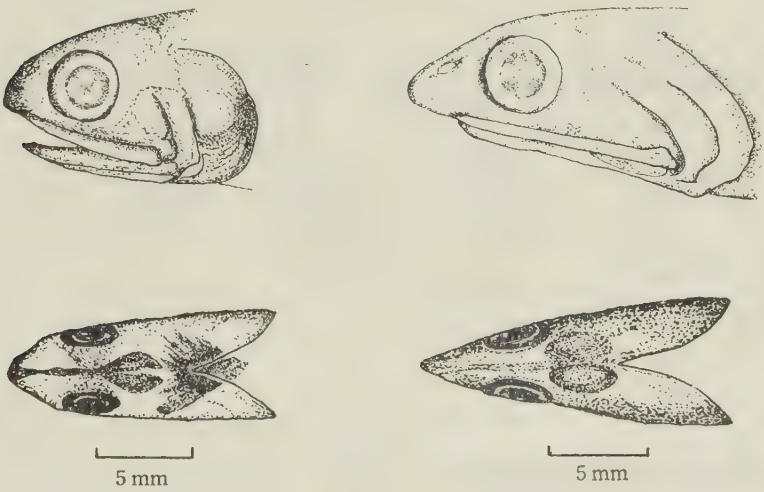
Anal ray count;

	Number of specimens	12	13	14	15	16	17	18	19
E. japonica	800	—	—	—	20	203	447	127	3
S. zollingeri	127	1	24	77	25	—	—	—	—



Stolephorus zollingeri *Engraulis japonica*

Fig. 1. Comparison of heads of *Stolephorus zollingeri* (30 mm) and *Engraulis japonica* (31 mm).



Stolephorus zollingeri *Engraulis japonica*

Fig. 2. Comparison of heads of *Stolephorus zollingeri* (60 mm) and *Engraulis japonica* (75 mm).

(Fig. 2), タイワンアイノコでは体側に巾広い暗色縦帯，腹中線に6または7個の稜鱗が現われるが，カタクチイワシでは体側の縦帯は明らかでなく，稜鱗がないことによっても区別される。

また，成長したカタクチイワシの腸は屈曲するが（雨宮ほか[1]），タイワンアイノコのそれは，体長70mmを超えてもほぼ直走する (Fig. 3)。

Fig. 3. Alimentary canal of *Stolephorus zollingeri*, 76mm in body length.

タイワンアイノコの出現状態

この研究に用いた標本は，元来カタクチイワシシラスの体節的形質の変異を知る目的で採集された。タイワンアイノコは一般に少ないので，体節的形質を算定するまでは，シラス漁獲物中のタイワンアイノコとカタクチイワシとを分離しなかつた。したがつて体節的形質を調査した個体中のタイワンアイノコの割合はシラス漁獲物における本種の混獲比の一指標と考えられる。

本調査結果によると，タイワンアイノコは茨城県（1958 年 4~9 月調査）にはまつたく出現せず，1958 年 5, 6 月の宮崎・佐賀両県および同年 5~7 月の長崎県産標本にも見られていない。それ以外の調査地である静岡，愛知，和歌山，山口（瀬戸内海側）の諸県には多少とも出現し，特に和歌山県ではかなり多い (Table 2)。

Table 2. Ratios in number of *Stolephorus zollingeri* in the *shirasu* samples by month and by prefecture, April 1958 to April 1959.

Year	Month	Shizuoka %	Aichi %	Wakayama %	Yamaguchi %
1958	Apr.	0.3(300)	0 (60)	0 (40)	—
	May	0 (400)	1.0(100)	1.4(140)	—
	June	0 (400)	1.7(120)	2.8(180)	—
	July	0 (200)	0 (60)	5.0(160)	0 (60)
	Aug.	2.1(280)	0.8(120)	41.7(180)	0 (20)
	Sept.	6.3(400)	—	11.5(160)	0 (60)
	Oct.	1.2(400)	0.4(220)	17.9(140)	0 (80)
	Nov.	0.5(400)	1.4(140)	13.0(100)	2.5(40)
	Dec.	0.2(400)	0 (40)	10.0(60)	0 (20)
1959	Jan.	—	—	22.5(40)	—
	Feb.	—	—	5.0(20)	—
	Mar.	—	—	21.3(60)	—
	Apr.	—	—	28.1(160)	—

Numerals in parentheses denote number of specimens examined.

これらの結果から 1958 年 4 月~1959 年 4 月におけるタイワンアイノコの出現状態は次のとおり要約される。

Table 3. An estimate of the catch of postlarvae of *S. zollingeri* on the Pacific coast of Wakayama Prefecture, April 1958 to April 1959.

Year	Month	Total catch of *Shirasu*	Postlarva catch of *S. zollingeri*
Total		1,159 ton	148.0 ton
1958	Apr.	155	0
	May	352	3.9
	June	37	1.2
	July	18	0.9
	Aug.	16	6.8
	Sept.	19	2.1
	Oct.	50	9.1
	Nov.	43	5.8
	Dec.	17	1.7
1959	Jan.	24	5.2
	Feb.	19	1.1
	Mar.	78	16.7
	Apr.	331	93.5

a．タイワンアイノコは黒潮の影響を強く受けている和歌山県太平洋沿岸でもつともひんぱんに出現した。

b．本種の分布は少なくとも静岡県（駿河湾）および瀬戸内海西部に達する。

c．本種は 1958 年には晩夏になつて出現し，春には少なかつたが，1959 年には冬から春にかけてもかなり現われた。すなわち，年により出現状態がいちじるしく異なる。

d．シラス漁獲物中の本種の混獲比は通例 10% を超えない。和歌山県太平洋岸では本種の混獲比が 1/2 近くに達した月もある。しかし，月別混獲比（重量）とシラス漁獲量[5] から推定された 1958 年 4 月～1959 年 4 月における同地方のタイワンアイノコシラスの漁獲量は 150 トン，本地方におけるシラス総漁獲量の 13% にすぎない (Table 3)。

また，南海区水産研究所の調査によると，宮崎県付近のカタクチイワシ漁獲物中タイワンアイノコがかなり多く混獲される年がある。したがつて，本種は特定の年には日本の黒潮流域に出現するが，それでもその量はカタクチイワシに比べて非常に少ないと考えられる。

1949 年以降の調査で明らかとなつたように，黒潮流軸の動向は，重要沿岸資源の変動を支配する大きな要因であろう[2]。したがつて，南方系のタイワンアイノコの出現状態は沿岸重要資源の環境条件を示す一指標として，さらに検討を要する問題を残していると思われる。

文　　献

1) 雨宮育作・日比谷　京・高　良夫：水産研究会報 (3), 83～91 (1950).
2) 沿岸重要資源担当官会議常任委員会：昭和 31, 32 年沿岸重要資源協同研究経過報告，307pp，水産庁 (1961).
3) HAYASHI, S.: 東海水研報，(31), (1961).
4) HAYASHI, S. and A. TADOKORO: 本誌，28(1), 26-29 (1962).
5) 農林省統計調査部：農林水産統計月報，nos. 77～89 (1958～1959).

1958 年東海区および東北海区における沿岸資源の漁況と魚価の関係

近　藤　恵　一

日本水産学会誌
第二十八巻　第一号　別冊
昭和三十七年一月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 28, No. 1, January 1962.

1958 年東海区および東北海区における沿岸資源の漁況と魚価の関係

近 藤 恵 一

(1961 年 11 月 8 日受理)

STUDIES ON RELATIONSHIPS BETWEEN AMOUNT AND PRICE OF THE MARINE FISH CATCH FROM THE PACIFIC COAST OF HONSHU IN 1958

Keiichi KONDO*

The present study covers the relationship between seasonal changes of the price and the amount of catch of important neritic-pelagic fishes landed on the Pacific coast of Honshu in 1958. The Pacific coast of Honshu is divided into Sanriku District extending from Aomori to Fukushima prefectures, Kanto District from Ibaraki to Shizuoka prefectures and Kinki District inclusive of Aichi and Mie prefectures. The data used for the present study have been obtained from governmental statistics on amount and price of catch for such species as the sardine, anchovy, mackerels, common squid, pampanos and yellowtail.

According to Fig. 1 prepared for this study, the following points of interest have been obtained:

1) The price of neritic-pelagic fishes under study rised in winter and lowered in summer. This seasonal fluctuation in price was the most remarkable for the yellowtail.

2) It is suggested that amount and price of catch were correlated negatively for the five species except sardine. The correlation coefficient at less than one percent level for the mackerels in Sanriku and Kinki Districts, and at less than five percent level for the yellowtail in Sanriku District (Table 1).

3) The negative relationship between the amount and price of catch was the most remarkable in Sanriku District, where the processing and transportation facilities have been the least developed.

4) The amount and price of catch as well as the fishing activity were related mutually in many commercial fisheries. As far the data under study are concerned, however, the price did not remarkably lower in spite of increase of catch. Therefore, it may be assumed that the catch statistics reflect the stock sizes of the fishes under discussion.

水産物の取り引きには商品（魚）の鮮度が価格決定に大きく影響し，また漁獲物の鮮度保持は畜産蛋白源に比べて著しく困難であり，かつ生産（漁獲）が平均しておらず，そのため局地的一時的多獲があつた場合には需給のバランスが破れやすく，いわゆる大漁貧乏という現象が起ると考えられる。これの対策として操業抑制の声もあり，極度な操業抑制があれば来遊資源量を推定する場合に漁獲量を修正する必要性も生じ，資源研究の面からも関心がもたれる。これらの問題を検討する一つの資料として 1958 年の東海区および東北海区における沿岸資源の魚種別漁獲量と平均価格の関係を調べたので，その結果を報告する。

I. 用いた資料と魚種

本研究には農林省統計調査部刊行の水産統計月報[1] および水産物市場価格調査報告[2] に記載された資料を

東海区水産研究所業績 B-362

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab., Chuo-ku, Tokyo).

用いた。昭和 33 年漁業養殖業漁獲統計表[3] の生産地市場別価格調査では，本州太平洋岸の生産地を三陸地方（青森県八戸から福島県小名浜まで），関東地方（茨城県那珂湊から静岡県清水まで）および近畿地方（静岡県焼津から和歌山県勝浦まで）に分けているが，本報告では漁獲量との対比をする必要上，統計調査部の地方分けを多少変更し，三陸地方は青森県から福島県まで，関東地方は茨城県から静岡県まで，近畿地方は愛知県および三重県とした。したがつて，静岡県焼津は関東地方へ入れ，和歌山県勝浦は除外して各地方の平均価格を算出した。また漁獲量もこの地方分けにしたがつて集計した。

本報告で取りあげた沿岸資源はマイワシ，カタクチイワシ，サバ類，スルメイカ，アジ類およびブリ類の6種類である。

II. 漁況の概要

1958 年における東海区および東北海区の総水揚量は 187 万トン（東海区 94 万トン，東北海区 93 万トン）であり，そのうち，ここで取りあげた沿岸資源漁獲量は 55 万トン（東海区 31 万トン，東北海区 24 万トン）で，総水揚量の約 1/3 を占めている。

魚種別漁獲量の季節変化を Fig. 1 に白丸で示したが，これに基づいて漁況の概要を述べる。

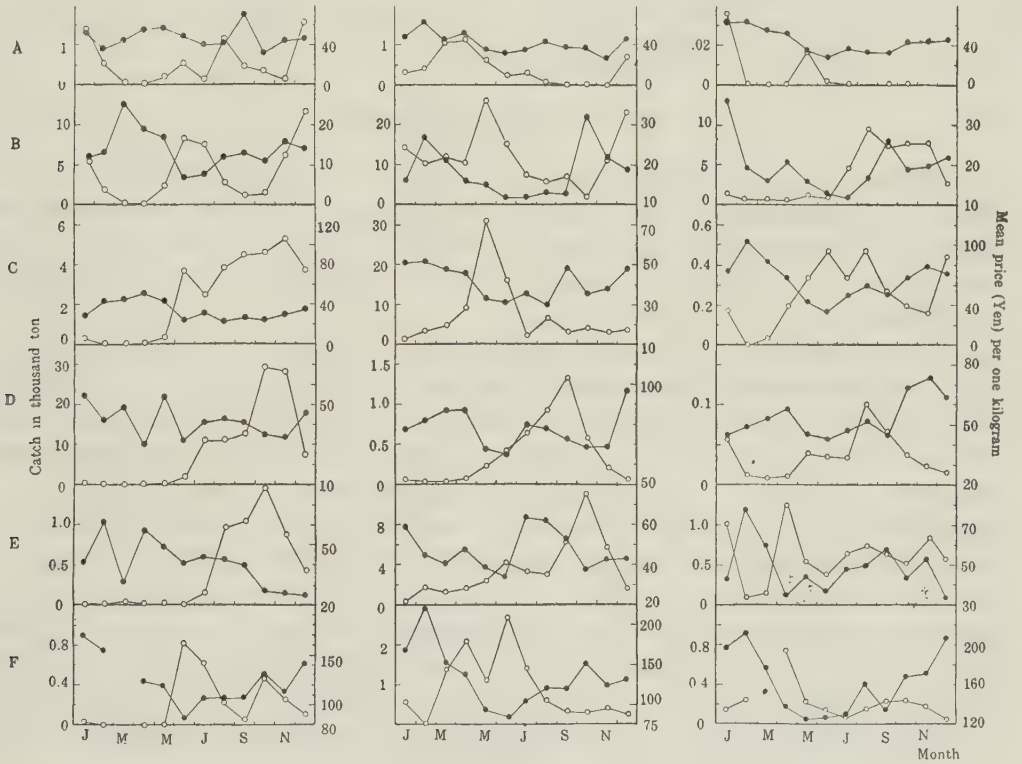


Fig. 1. Monthly catch and mean price of neritic-pelagic fishes (A–F) in Sanriku (left), Kanto (center) and Kinki (right) Districts, 1958. A: sardine, B: anchovy, C: mackerels, D: common squid, E: pampanos, F: yellowtail. Open circle, amount of catch; closed circle, mean price.

マイワシ: 本種は常磐房総海域で一つの漁場を形成しているが，常磐海域（福島・茨城県沖）では主に冬季あぐり網漁業によつて漁獲されているに対し，房総海域（千葉県銚子沖）では主に流網漁業によつて漁獲され，漁期も常磐海域でほぼ終漁となつたのちに漁獲されている。なお，房総海域における大羽マイワシ対象の流網漁業は他県船の入漁も含め，この年から急激に増加している[4]。

1958 年における三陸地方のマイワシ漁獲量は 6,700 トンであるが，福島県のみでその 8 割を漁獲している。この年の福島県における主漁期は 1，2 月および 12 月の 3 カ月に限られ，その間の漁獲物は 1957 年級（I 年魚；体長 12～18cm）が主体を占めている[5]。関東地方の漁獲量は 4,800 トンで，その 94% は千葉・茨城両県に水揚げされ，神奈川県以西では皆無に近い。流網漁業の主漁期は 3～5 月であるが，このほかあぐり網漁業による冬季の漁獲量もすくなくない。

カタクチイワシ：本州太平洋岸総量に対する地方別漁獲量の割合は三陸，近畿両地方がいずれも 20%（4.9 万トンと 4.3 万トン），関東地方が 60%（14.9 万トン）である。主漁期は三陸，関東両地方ではほぼ似かよつているが[6]——4～6 月の春季と 1，2 月および 11，12 月の冬季——，近畿地方では伊勢湾のバッチ網漁業が解禁されてのち年末まで漁獲が引き続いている。

サバ類：本種漁獲量の 74%（8.9 万トン）は関東地方で漁獲され，主漁期は 4～6 月である。

スルメイカ：本種の 96%（10.2 万トン）は三陸地方——主に青森，岩手両県沖——で 7～12 月（主漁期は 10，11 月）に漁獲され，残りのわずか 4% が関東，近畿両地方で漁獲されている。

アジ類：本種の主漁場は関東地方（77%；4.1 万トン）で，主漁期は 9～11 月である。他の地方は漁獲量もすくなく，漁期も明瞭でない。

ブリ類：主漁場は関東地方（70%；1.1 万トン）で，その主漁期は 3～6 月である。本種の漁獲量は決して多くないが，単価が高いため，定置漁業等の重要な魚種となつている。

III. 平均価格とその季節変化

ここで取り扱かつた各地方の平均価格とはその地方内の水揚地における月別価格の平均値である。各地方で調査された水揚地数は三陸地方で 2～8，関東地方で 3～9，近畿地方で 1～4 である。各地方の平均価格を算出する場合，当然漁獲量による加重平均を使うべきであるが，用いた資料では取り扱い数量 1 トン未満は 0 と記載されており，これを除外すると水揚地数がさらに少なくなるため，ここでは単純に水揚地別価格の相加平均を用いた。

同一地方内各水揚地間の価格が比較的安定している魚種はマイワシ，サバ類およびブリ類の 3 種類である。一方，アジ類の変動係数は年間を通じて常に大きく（約 50%），スルメイカは 1～4 月および 9～12 月の両期間で大きく変動し（前者 40%，後者 60% くらい），漁獲量の多い期間（10，11 月）のみ変動係数が特に大きくなるとは限らない。カタクチイワシはもつとも大きい変動を示し，三陸地方 3 月の変動係数は 104% に達している。

平均価格の季節変化は Fig. 1 に黒丸で示したが，いずれの魚種も冬季に高く，夏季に安い傾向を示し，その季節変化は三地方ともほぼ平行的である。価格の季節変化のもつとも顕著な魚種はブリ類である。

各地方ごとの平均価格を比較するとサバ類，スルメイカおよびブリ類では価格の地域差が認められるが，その他はほとんど差が認められない。サバ類の価格は年間を通じて常に近畿地方でもつとも高く，三陸，関東両地方の 2 倍以上の高値を示す月もある。スルメイカの価格は年間を通じ三陸地方が関東地方の 1/2 以下である。これは漁獲量の地域差によるものと考えられるが，三陸地方で漁獲のもつとも多い 10，11 月に特に著しい価格の暴落が起つていない。ブリ類の価格は 4 月以前においては近畿地方と関東地方との間に大差はないが，それ以後では近畿地方のものが約 40～60 円の高値を示している。

IV. 漁獲量と価格の関係

II および III で述べた漁況と魚価の相互関連をみると，各魚種とも変動は大きいが，一般的傾向として，漁獲量の多いときに価格の安い傾向が示されている（Fig. 1）。試みに両者の相関係数を算出すると Table 1 に示したとおり，例外的にマイワシの三陸および近畿地方で極めて低い正相関が得られているが，ほかはすべて負相関である。もつとも，統計的には三陸および近畿地方のサバ類では危険率 1%，三陸地方のブリ類では危険率 5% で有意な負相関が得られているが，ほかの場合の相関は有意でない。また，三陸地方のス

Table 1. Correlation coefficient between monthly catch and price of neritic-pelagic fishes in Sanriku, Kanto and Kinki Districts, 1958.

Fishes	Districts	Correlation coefficient
Sardine	Sanriku	−0.01
	Kanto	0.45
	Kinki	0.30
Anchovy	Sanriku	−0.53
	Kanto	−0.26
	Kinki	−0.02
Mackerels	Sanriku	−0.78**
	Kanto	−0.51
	Kinki	−0.78**
Common squid	Sanriku	−0.43
	Kanto	−0.39
	Kinki	−0.28
Pampanos	Sanriku	−0.55
	Kanto	−0.25
	Kinki	−0.56
Yellowtails	Sanriku	−0.61*
	Kanto	−0.53
	Rinki	−0.26

Significant difference at probability is denoted as:
* less than 5%　　** less than 1%

タクチイワシとアジ類，関東地方のサバ類とブリ類および近畿地方のアジ類などは統計的に有意でないが，見掛け上負相関を比較的明瞭に示している。

また，スルメイカでは漁期も漁場も限定されているにもかかわらず，漁獲量の著しく増大している10, 11月で特に顕著な価格暴落は起つておらず，主漁場の三陸地方でさえも統計的に有意な負相関が得られていない。

さらに，これらの相関を各地方別に対比してみると，いずれの魚種でも三陸地方が常に比較的高い負相関を示している。アジ類では漁獲量のもつとも多い関東地方がもつとも低い負相関を示し，漁獲量が関東地方の1/5以下である三陸，近畿両地方で高い負相関を示している。ブリ類も同様に漁獲量の多い関東地方より漁獲量の少ない三陸地方が高い負相関を示している。

V. 考　　察

一般に魚価は単に漁獲量のみでなく，漁獲物の質的な面（魚体の大きさ，鮮度および味の良否など）や食生活の慣習などの季節変化によつても支配され冬季に上昇する傾向がある。その最適例としてブリ類がある。**III** で述べたように，本報で取り扱かつた沿岸資源のなかでは，ブリ類の価格がもつとも顕著な季節変化を示し，これは漁獲物の質的相異（冬季の寒ブリと初夏のイナダ）と冬季における正月用祝儀品としての需要の増大などが主な原因と考えられる。また，1958年冬季におけるサバ，ブリ，スルメイカは魚体が小型であつたため，これらの事情を考慮すると，**IV** で述べた相関はさらに低下すると予想される。

さらに，社会的条件として加工施設の発達程度，流通機構の問題，あるいは消費地との関係なども複雑にからみあい，単純に漁獲量との関係のみを重視するわけにはいかない。すなわち，三陸地方が常に比較的高い負相関が得られていること（アジ類のように三陸地方の漁獲量が関東地方の1/5以下の場合でも）などはその良い例である。

また，ここでマイワシのみ特例として正相関が得られたことは太平洋岸におけるマイワシ漁獲量の水準が極めて低く，漁獲量と価格の間に負相関を示すまでの量に達していないためとも考えられるが，これをマイワシ全国漁獲量と関東および近畿地方おのおのの価格と比較すると，むしろ他魚種同様負相関を示し，この点からは全国漁況もいくぶん影響した結果とも考えられる。しかし，この問題はここで用いた資料だけではいずれとも断定しがたい。

さらに，別の観点から，本報で用いた資料は比較的長期間（月），しかも，かなり広い地域にわたつて平均されているため低い相関が得られたとも考えられる。したがつて，この研究を進めるには局地的かつ短期間に区分された資料を用い，同時に銘柄別（魚体の大きさなど）も考慮する必要がある。ただし，ここでは漁獲量の多い月，あるいはその翌月に特に顕著な価格の暴落が起つていないところからみて，少なくともこの年においてはたとえ多獲による魚価の暴落が局地的，一時的にあつたとしても，それは大局的にみていわゆる大漁貧乏というほどのものでなく，また資源量を推定するさいに漁獲量の修正を必要とするほどの漁業抑制があつたとは考えられない。

岡田[7]は 1935 年に北海道厚岸沖のトキシラズ *Oncorhynchus keta* (WALB.) について，その魚価が漁獲量のみなら手初漁日からの日数や出漁船数によっても影響されることを述べ，さらに他の要因による影響も予想している。本報では漁獲量以外の要因の影響については資料による検討はできなかったが，単価の昇降にある一要因のみを重視できない点で見解が一致している。

終りに臨み，本研究の御指導を頂いた東海区水産研究所中井資源部長，また理解ある援助と助言を受けた同所林（繁）技官，計算の労をわずらわした同所日下部事務官に対し，心から厚く御礼申し上げる。

文　　献

1) 農林省統計調査部：水産統計月報，昭和 33 年 1～12 月 (1958, 1959).
2) ：水産物市場価格調査報告；昭和 33 年 1～6 月，同年 7～12 月 (1959).
3) ――――：昭和 33 年漁業養殖業漁獲統計表 (1959).
4) 東海区水産研究所イワシ資源科：沿岸重要資源調査研究ならびに漁況海況予報調査に関する報告（速報），9, 10 頁，東海区水産研究所 (1959)，謄写刷.
5) 東海区水産研究所：昭和 33 年沿岸重要資源協同研究経過報告（案），49～52 頁 (1960).
6) 林　繁一・近藤恵一：東海区水産研究所研究報告 第 **26** 号，21～41 頁 (1959).
7) 岡田光世：本誌，**8** (1)，14～15 頁 (1939).

POPULATION STUDY ON THE FUR SEAL HERD*

F. NAGASAKI**

* Received Nov. 22, 1961. Contribution B No. 365 from the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory.

** The author's present address: c/o Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Fisheries Agency, Tsukishima, Chūo-Ku, Tokyo, Japan.

CONTENTS

General account

Summary

Introduction

Page

1. Brief history of the fur-seal research 2
2. Analysis of bull count and commercial kill size 4
3. Estimation of pup production from tag-recovery results 13
4. Segregative distribution and intermixture among different origins 19
5. Change in the growth rate of the Pribilof seal 29
6. The pregnancy and the mortality rate of fur-seals 33
7. Pup mortality on land 39
8. Relationship between pup-production and annual yield 43
9. Reconstruction of the reproductive scheme 48
10. Sustainable yield from the herd 55

References 58

GENERAL ACCOUNT

The northern fur-seal, *Callorhinus ursinus*, is an amphibious animal. In summer, fur-seals breed mainly on groups of islands in the northern Pacific, the Pribilof Islands off Alaska, the Commander Islands off Kamchatka and Robben Island off Sakhalin. In winter and spring, the seals migrate along both sides of the Pacific Ocean, some reaching as far south as northern Mexico and Chiba Prefecture of Japan. Some spend their pelagic life in the Sea of Japan, although the migration route there is not yet clarified. They are found in waters with a surface temperature of 0°–20°C. It is observed that they have no particular preference for definite water temperature but occurr most abundantly in the mixing area between the warm and cold waters. As a very complicated segregative distribution is observed both in the pelagic life and on the breeding islands, the composition both of the pelagic kill and of the land kill do not represent the real composition of the herd. These segregative habits make the fur-seal population study rather difficult. In addition to segregation by age and sex, intermixing among different origins occurrs on sea. For instance, the seal group migrating off Sanriku district in spring is comprised of seals of Robben, the Commander and Pribilof origins.

Throughout the pelagic life, they feed on fish and squids. Since no selectivity in feeding is observed, various species of fish are identified in fur-seal stomachs. From late spring they gradually assemble at the island where the mature males over 7 year old and the reproductively matured-females land on definite areas called harem grounds. The immature or younger males occupy the bachelor grounds, adjacent to the rookeries. They do not participate in reproductive activity.

The strong mature male guards harem on a territory. The number of females belonging to a harem varies from one or two up to more than 100 individuals. Pregnant females give birth to a pup several days after her arrival at a rookery. Female seals begin to conceive at age 3 or older. The pregnancy rate of female seals older than age 5 is quite high, amounting to about 80–90 per cent. After the mating season has over, the harem organization gradually breaks down.

Since the bachelor seals, on the bachelor or hauling ground, do not participate in reproductive activity, they are subjected to land killing. The catch, therefore, comprises mostly 3 and 4 year old male seals. Due to the polygamous reproductive behavior, the reduction of males, in certain extent, is not harmful at all to maintaining an increasing recruitment.

From the beginning of autumn, they gradually leave the islands and start their migration to southern waters.

Male seals grow larger than females. Males grow continuously up to age 10 but the growth in females has almost ceased at around age 5. Age-determination is based on counts of annual thickenings, or growth ridges, on the root of the tooth. Each ridge presumably represents a period of active feeding during the spring of the year.

Tagging experiments are very effective in the biological study of the fur-seal. A large

number of tags, made of monel metal, has been placed on pup seals on the breeding islands.

In the case of mammals, in general, such as the fur-seal and whales, the recruitment is limited, compared to fish so that exploitation should be carefully regulated for keeping the stock size. Fur-seals have been subjected to commercial kill for two hundred years. At the beginning of this century, the abundance of this species was once reduced to a extremely low level by reckless exploitation in the North Pacific Ocean. Since 1911, however, when the first protective treaty was established among four countries, Japan, Canada, U.S.A. and Russia, the abundance has been gradually increased. In 1957, four countries, mentioned above, contracted the new treaty which provides internationally coordinated study on various aspects of fur-seal biology. This is the stage now for biologists to collect more data and information for establishing the most intelligent method for attaining the maximum sustainable yield from the fur-seal stock.

SUMMARY

In Section 1 is briefly reviewed the outline of the fur-seal research so far conducted.

In Section 2, the statistics obtained for a period of years on the Pribilof Islands such as the annual number of bulls counted and the commercial kill size are analysed. Analysis indicates that the increase in these figures since 1911 does not represent the real potential growth of the Pribilof herd. It also reveals that it is not appropriate to fit a logistic curve culculated from these statistics to the population growth. Judging from the age-specific pregnancy rate observed and the annual rate of increase in pup-production, that is about 8 per cent in the 1910's, it is suggested that the mortality rate of older seals than age 4 should be less than 10 per cent in a year.

In Section 3, the pup-production on the Pribilofs for recent years are calculated from tag-recovery results. Calculated results by Petersen's and the stratified method are compared and it is concluded that the result by Petersen's is more dependable in this case than that by the stratified method. Estimated pup-production has sharply increased since 1953 up to 1956.

In Section 4, the segregative distribution of seals both on land and on sea is demonstrated, and the intermixing of seals of difierent origins in waters off Sanriku district is studied. The intermixture of seals from the three breeding islands or island groups is also considered. It would be concluded that almost all of the yearlings migrating off Japan originate at the Soviet breeding islands. The intermingling ratio of the Pribilof seals off Japan may increase as age increases. A fraction amounting to 30–40 per cent, of younger males in the three and four year old groups on the Commander Islands are of the Pribilof origin, while the immigration from the Pribilof Islands to Robben Island is of light extent. Evidence to date also shows movement of seals of Asian origin to the Pribilofs.

In Section 5 is considerded the retarded growth rate of the Pribilof seals in recent years. This may be reflected by the higher density of younger seals from the Pribilofs in these years.

In Section 6, the age-specific pregnancy rate and mortality rate which are essential to

approach the study of the population dynamics of the stock are considered on the baisis of various samples so far collected. The age-specific mortality, however, can not be figured out from the catch-composition because of remarkable segregative distribution both on land and on sea.

In Section 7 is considered the relationship between the number of pup born and the number of dead pups counted on the Pribilofs. The mortality rate of black pups during the puping season may be dependent on the total number of pups born.

In Section 8, the relationship between pup-production and the resultant return at age 3 is discussed.

Although the biological mechanism is not yet known, the mortality rate from pup stage up to age 3 may be changed by the density of pups produced. Several reproduction curves are fitted to this relationship. It may be concluded that the maximum return at age 3 is expected when the fall pup population on St. Paul Island amounts to about 400,000 individuals.

From the reproduction curve obtained, together with the estimated number of pups born since 1912, the reproduction schedule of the herd is constructed on the basis of various properties which are obtained in the previous sections. It is estimated from the reproduction scheme that the exploitation rate for the 3 year old males has been roughly 50 per cent. These considerations are given in Section 9.

In the last section is given the maximum sustainable yields both from male and female groups which is expected from the population model given in Section 9.

POPULATION STUDY ON THE FUR-SEAL HERD

INTRODUCTION

The fur-seal stock in the North Pacific Ocean has been managed under the Interim Convention on Conservation of North Pacific Fur-Seals which was contracted in 1957 among four countries, Japan, Canada, U.S.S.R. and U.S.A. It is well-known that the abundance of this animal was once reduced to an extremely low level by disordered exploitation throughout the last century[1]. No one doubts that the sealing regulation provided by the first treaty, established in 1911, was apparently effective in increasing the stock size of this species. Although the information on the stocks both on the Commander and Robben Island is still poor, the seal herd on the Pribilofs off Alaska which occupies more than ninety per cent of the total abundance in the North Pacific has been increasing since 1911 because of successful conservation measures, that is, the prohibition of pelagic sealing and killing only young males selectively on land. The 1911 treaty had remarkable significance as the first demonstration of the possibility that the stock size of marine living organisms in nature can be regulated artificially through controlling exploitation effort and regulating catch composition.

It is generally believed that the stock size on the Pribilofs in these years has reached the ceiling level. Meanwhile, the population dynamics of the fur-seal herd has not necessarily been clarified yet. The sealing practice so far carried out has been simply based on the principle which is originated from the characteristic reproductive behavior of this animal that a reduction of the surplus males would not be harmful to maintenance of increasing recruitment. The kill restricted to bachelors is logical and practical only when a reduced abundance is to be restored. In the present stage, however, when the population size is almost leveled off, the maximum sustainable yield should only be established on the basis of the study on various properties of the population in question. Due to the very significant segregative habits of this species either on the breeding islands or at sea, together with the intermixture of seals from different origins, it is very difficult to calculate the properties of the population such as mortality and pregnancy rates. The Commission formed under the current fur-seal convention is now compiling various data and information for this purpose through the internationally coordinated survey.

Although the available data in hand is still limited, the present Author makes some speculative considerations on a possible approach to attain a sustainable yield at a higher level from the fur-seal herd. He also believes that the conclusion of this thesis will be more or less revised in the future by the progress of research.

1) The detailed information both of the fur-seal herd and the sealing industry in the North Pacific before the first fur-seal treaty is described by Stejneger (1896–1897) and Jordan (1898–1899). The brief history of the fur-seal industry is summarized by Nagasaki (1953).

1. BRIEF HISTORY OF THE FUR-SEAL RESEARCH

The northern fur-seal was described in the Linnean classification of 1758 as *Phoca ursina*. In 1899 Jordan and Clark split it into three different species, *Callorhinus ursinus*, *C. curilensis*, and *C. alascanus*, representing seals on the Commander, Kurile (including Robben Island), and Pribilof breeding islands, respectively, mostly on the basis of different coloration. Lucas (1899) also remarked that the Pribilof seal varies in size and proportions to such an extent that they might be held as belonging to two distinct species. However, as Wilke (1951) stated, little dependence can be placed on color in distinguishing animals from the various breeding colonies because the color differences between pelagic and island seals, especially mature females, are so marked. Allen (1942) considered that seals of these three colonies should de treated as different sub-species in a species. Hall (1940) and Kuroda (1938), on the other hand, stated that they belong to a single species. Wilke (1950), comparing several proportions in the skull of seals older than four year old between those taken off Japan and on Pribilof Islands, concluded that there is no significant difference between them. Taylor *et al* (1955) made the same kinds of morphometric comparison among seal groups collected off Japan, off America and on the Pribilofs but no morphological difference was detected. The present Author considers that further morphometric approach may not be important for stock identification, because extensive tagging is bringing detailed information on the intermixture among different origins.

It has been suggested since about 1860 that some Pribilof seals move to the Commander Islands. Since then, many marked seals were liberated from the Pribilofs but no systematic recovery was made either on the Commanders or Robben. Ishino observed three branded male seals on the Commanders in 1925 and also some on Robben in the 1926–29 seasons. The branded ones apparently immigrated there from the Pribilofs. In 1933, the Japanese Government reported that a considerable number of seals wintering off Japan bore metal tags which were placed on the Pribilofs. The study on composition of the wintering group off Japan by different origins by means of tag recovery was initiated by Wilke (1951) and developed by the joint research carried out in 1952 (Taylor *et al*, 1955).

The study on the size of the seal herd on the breeding island have been mostly carried out on the Pribilofs and more recently on the Commander Islands and Robben Island. Since over 90 per cent of the seals in the northern Pacific is of the Pribilof origin, the general trend of the change in the abundance can be followed by the results of surveys carried out on the Pribilofs. The first estimation of the total abundance on the Pribilofs ever made was by Bryant (1869) by means of the areal computation[1]. Elliot (1882), basing on his surveys in the 1872–73 seasons, computed the total number of Pribilof seals as 4,700,000 individuals by this method. Jordan & True (1898–99) and Townsend (1896) made the same kinds of estimations. An alternate way to compute the total number is the proportion method[2]

1) This method of estimation might be dependable if seals distribute themselves evenly on a rookery. As this is not the case and the geographical condition of a rookery differs from place to place, this kind of computation is not effective even for estimating a total number of seals at a certain moment.

2) It is extremely difficult to estimate the total number of seals by this type of method because the size of a harem differs widely not only by its location on a rookery but also by the time of a day.

which had been applied from the 1900 to 1920 season. This method, considered to be more accurate and practical than other one, is to compute the total number of seals landing on a rookery from the average number of seals belonging to a harem and the total number of harems counted there. Since 1911 the U.S. Government had carried on a careful investigation in every season. In 1914 a coordinated survey by scientists from Japan, Canada and U.S.A. Kitahara, 1915 was carried out. In earlier years when the population density was still at a low level, the computation may be fairly accurate and dependable because counting of harems and the average size of harem is easy. Hanna (1921), however, reported that the counting was becoming very difficult because of crowding on the rookeries. Christoffer (1937) and his associates also reported that it was almost impossible to make a full computation because of increased density but the over-all rate of increase on the Pribilofs was approximately 8 per cent a year. Since then, the official statistics given in the annual publication, "Alaska Fishery and Fur Seal Industries", have been based on the computation from the annual rate of increase, that is 8 per cent up to 1941 and 7 per cent until 1946 and 6 per cent after 1947. Meanwhile, no appreciable study was made until the late 1940's except the routine work of counting number of bulls and measuring the commercial kill. A group of American biologists started extensive tagging operation in 1947 when a series tags, amounting to 20,000, were placed on pup seals. Since then, tagging has been continued. Together with tagging experiment, studies of various aspects of the fur-seal biology such as dead pup counting, hook-worm injury, estimation of escapement and so on have begun. These recently developed studies are greatly aided by the newly established age-determination method proposed by Scheffer 1950 [1]. Kenyon *et al* (1954) calculated a life-table for the Pribilof seal herd on the assumption that the abundance has reached ceiling level and estimated the total number as 1,530,000 individuals. From the 1958 season when the current treaty came into effect, the our contracting countries coordinated research both on land and at sea.

Statistics now available for analizing the properties of the Pribilof fur-seal herd being obtained for a period of years are as follows:

1 Number of harem and idle bulls counted on the Pribilofs year after year since 1911.

2 Number of bachelor seals killed commercially on the Pribilofs since 1918.

3 Number of pups born and of dead pups counted on the Pribilofs from 1912 up to 1922. Number of dead pups counted are also available for recent years.

In addition to these statistics, the results of fairly extensive tagging experiments were obtained from the commercial kills since 1950 up to the latest year.

Some considerations on the growth trend of the stock have already been published by Kenyon *et al* (1954) on the basis of bull counts and commercial kills. As is discussed in Section 2 of this thesis, however, these two series of statistics themselves do not represent the real growth potential of the stock. Therefore, the present Author makes a different type of approach to the population dynamics of the fur-seal herd on the basis of the numbers of pups born estimated from tag-recovery results and the commercial kill size for rather recent years. The reproductive scheme of the herd, thus obtained from recent data, is applicable to explain the real growth pattern of the stock.

1 Age-determination is made by counting the annual rings appeared on the canine tooth of seal.

2. ANALYSIS OF BULL COUNT AND COMMERCIAL KILL SIZE

A. Bull count result

Male seals begin to produce spermatozoa at age three or four and reaches sexual maturity at five or six. Because of very serious competition among matured males, however, as a result of the polygamous behavior in the breeding season, male can not hold a harem before age seven or older. Male of age twelve to fifteen are considered to be in the height of actual reproduction activity. Males younger than age seven are called bachelors and the seven or older are defined as bulls. Ecologically speaking, the bull group is comprised harem and idle bulls. A harem bull is a bull occupying harem territory on a rookery regardless of its area. A bull with no female at a certain moment should be called a harem bull if he holds territory, because females are frequently absent for feeding. Bulls staying outside of the rookery are called idle bulls. The idle bull group includes young males, 7 years old or younger, and the old and exhausted bulls.

a. Behavior of harem bull

A harem bull is defined, as mentioned above, as a male holding territory on a rookery. He holds a harem territory no matter how many females are in it. Kenyon *et al* 1954 stated that a harem bull guards his harem without either getting into water or feeding, while the Author observed on Robben Island that even a harem master moves to the sea at times in a day time. This movement may not be for feeding at sea but for immersion. The number of females belonging to a harem varies greatly according to the time of day. The number of bulls in the water increases in the daytime particularly on a warmer day and decreases in the late afternoon. As a result, the number of bulls on land, apart from those in water, changes not only by the time of day but also by climatic condition. It is also noticed that the number of harem bulls varies according to progress of the season. According to observations made by Soviet biologists on Robben Island in 1959[1], the number of bulls gradually increases from the end of May until the end of June when it reaches to the maximum. After that it declines gradually day after day. A summary of other observations made on Robben Island is given below:

1) Part of the bulls who had arrived to the harem rookery before females did, left the rookery when mass arrival of females started, and were replaced by other bulls.
2) Very few bulls stayed on the harem rookery for more than a month.
3) Temporary absence from the rookery during the harem period of their life some of them were absent even several times) is usual for many harem bulls.
4) The harem bulls who leave the rookery of their own accord, usually return to the place they left.

Bartholomew (1953) observed that the total period of harem duty for 16 bulls ranged from 18 to 41 days with a mean of 31 days. The longest period ever recorded is 59 days (Scheffer, 1950-a) but some bulls undoubtedly remain longer.

1. From the report submitted by Soviet Government to the Fur-Seal Commission in 1960.

b. Analysis of harem and idle bull count results

The number of harem and idle bulls counted on the Pribilofs since 1911 are given in Table 1. This series of statistics has been made by means of direct counting by American Government officials once in a year. Actual counting was carried out in the middle part of July and was completed in eight to ten days. Since the number of harem bulls varies by the progress of season and the member of harem master interchanges after a period of harem duty, as mentioned above, the number of harem bulls given here does not necessarily represent the absolute magnitude of potential reproduction. However, this series of statistics, together with that of annual commercial kill would be a valuable clue for following the quantitative change of the Pribilof fur-seal herd. Kenyon *et al* (1954) estimated the growth trend of the herd on the basis of these statistics. As is clearly shown in Figure 1, the growth trends in the numbers both of harem and idle bulls on St. Paul Island are quite identical to those on St. George. Taking those on St. Paul as an example, therefore, the number of harem bulls counted increased sharply since 1911 but decreased after 1920. It rose again from 1925 until about 1935. Thereafter, it has been stabilized around 10,000 individuals. The sharp increase from 1911 up to 1917 is apparently due to the stoppage of land killing on the Pribilofs from 1912 to 1917, in addition to the entire prohibition of the pelagic sealing provided by the Convention. The harem bull number began to decrease since 1919 because of the direct effect of land killing reopened since 1918. Judging from the short time lag between the start of land killing and its effect on the harem bull number, it is assumed that a harem bull might be generally younger in earlier years than in recent years. This would be easily understood by the finding that the size of the Pribilof seal either in body-length or in body-weight was significantly larger in earlier years than in recent years, as is discussed in Section 5. The decline at that time was temporal because the number began to increase again since 1925 despite the fact that land killing has been continued since 1918. This indicated that the decrement of harem bulls did not act upon the reproductive potential to maintain a increasing pup-production, because the annual pup-production during that period had increased steadily (see Section 7). The steady increase of pup-production resulted restoration of the number of harem bulls after 1925. This point will be considered further in detail in later section. Table 2 shows that the number of harem bulls landing on a given rookery has been almost constant throughout these ten years. This suggests that the quantitative distribution by rookery is stabilized.

The change in the number of idle bulls is quite similar to that of harem bulls. It is noticed that the ratio of the number of idle bulls to that of harem bulls, defined hereinafter as the idle index, is higher when harem bulls are comparatively abundant but lower when they decrease. This suggests that more idle bulls were recruited to harem bull group in the scarcity of harem bulls. In other words, the number of harem bulls is regulated by the idle bull group in the case of unbalance in the numbers between harem and cows. The number of idle bulls has shown rather exponential increase since 1925 up to these years despite that the harem bull number stabilized after 1935. Therefore, the number of total bulls counted has been increasing up to the latest year. Particularly from 1950, fairly regular increase has been observed in the number. Taking 1949 as the origin of time and

Table 1. Statistics of bull count on the Pribilofs since 1911.

Year	St. Paul			St. George			Total		
	Harem	Idle	Idle index	Harem	Idle	Idle index	Harem	Idle	Idle index
1911	1,090	258	0.24	266	71	0.27	1,356	329	0.24
12	1,077	93	0.09	281	20	0.07	1,358	113	0.08
13	1,142	77	0.07	261	28	0.11	1,403	105	0.07
14	1,316	159	0.12	243	13	0.05	1,559	172	0.11
15	1,789	546	0.31	362	127	0.35	2,151	673	0.31
16	2,948	2,378	0.77	552	354	0.64	3,500	2,632	0.75
17	4,166	2,341	0.56	684	365	0.54	4,850	2,706	0.56
18	4,610	2,245	0.49	734	199	0.27	5,344	2,444	0.46
19	4,573	2,158	0.47	585	81	0.14	5,158	2,239	0.43
20	3,542	1,078	0.30	524	83	0.16	4,066	1,161	0.29
1921	3,443	711	0.21	466	36	0.08	3,909	747	0.19
22	3,184	493	0.15	378	15	0.04	3,562	508	0.14
23	3,051	303	0.10	361	9	0.02	3,412	312	0.09
24	3,127	375	0.12	389	15	0.04	3,516	390	0.11
25	3,103	283	0.09	423	28	0.07	3,526	311	0.09
26	3,478	368	0.11	556	55	0.10	4,034	423	0.10
27	3,916	846	0.22	727	126	0.17	4,643	972	0.21
28	5,059	1,208	0.24	991	241	0.24	6,050	1,449	0.24
29	5,998	1,339	0.22	1,189	294	0.25	7,187	1,633	0.23
30	6,823	1,555	0.23	1,489	344	0.23	8,312	1,899	0.23
1931	7,557	1,519	0.20	1,676	369	0.22	9,233	1,888	0.20
32	8,268	1,940	0.23	1,820	409	0.22	10,088	2,349	0.23
33	8,334	1,933	0.23	1,879	408	0.22	10,213	2,341	0.23
34	8,841	1,860	0.21	1,929	422	0.22	10,770	2,282	0.21
35	9,444	2,082	0.21	2,103	453	0.22	11,547	2,535	0.22
36	10,055	2,253	0.22	—	—	—	—	—	—
37	10,689	2,516	0.23	2,411	515	0.21	13,100	3,031	0.23
38	10,720	1,787	0.17	—	—	—	—	—	—
39	9,122	2,616	0.28	1,858	357	0.19	10,980	2,973	0.27
40	9,662	3,968	0.40	1,988	571	0.29	11,650	4,539	0.39
1941	10,089	5,059	0.50	1,942	396	0.20	12,031	5,455	0.45
42	—	—	—	—	—	—	—	—	—
43	10,048	3,523	0.32	2,107	330	0.16	13,055	3,853	0.30
44	11,080	2,539	0.23	2,294	450	0.20	13,374	2,989	0.22
45	10,750	4,054	0.38	2,434	750	0.31	13,184	4,805	0.36
46	10,566	3,605	0.34	2,430	611	0.25	12,996	4,216	0.32
47	10,160	3,331	0.33	1,808	479	0.26	11,968	3,810	0.32
48	10,386	3,400	0.33	1,814	563	0.31	12,200	3,963	0.32
49	9,304	2,861	0.31	1,745	552	0.32	11,049	3,413	0.31
50	9,442	3,152	0.33	1,959	574	0.29	11,401	3,726	0.33
1951	9,434	3,581	0.38	1,825	549	0.30	11,259	4,130	0.37
52	9,318	4,717	0.51	1,983	605	0.31	11,301	5,322	0.47
53	9,848	5,912	0.60	2,285	826	0.36	12,133	6,738	0.56
54	9,906	6,847	0.69	2,228	1,311	0.59	12,134	8,158	0.67
55	9,034	8,650	0.96	2,130	1,902	0.89	11,164	10,552	0.95
56	9,384	9,016	0.96	—	—	—	—	—	—
57	9,562	10,060	1.05	—	—	—	—	—	—
58	9,970	9,510	0.95	—	—	—	—	—	—

Figures from 1911 up to 1951 are cited from Kenyon *et al.* 1954, and those since 1952 are from "Alaska fur seal investigations. Pribilof Islands, Alaska" published annually by U.S. Fish and Wildlife Service. Counts were not made on St. George Island in 1936 and 1938 because of bad weather, and on either island in 1942 because of the war.)

Table 2. Number of bulls counted by rookery on the Pribilofs.

	1949		1950		1951		1952		1953	
	Harem	Idle	Harem	Idle	Harem	Idle	Harem	Idle	Harem	Idle
ST. PAUL ISLAND										
Gorbatch	828	422	845	525	802	598	852	662	860	742
Ardiguen	114	14	105	10	102	12	95	20	96	80
Reef	1,806	835	1,587	701	1,618	826	1,523	1,267	1,585	674
Polovina	294	178	312	190	324	275	343	375	309	470
Polovina cliffs	512	112	649	93	788	187	545	210	623	313
Little polovina	203	34	270	55	252	75	246	160	253	204
Morjovi	468	138	579	195	686	317	644	297	594	762
Vostochni	1,572	358	1,510	494	1,621	475	1,580	635	1,673	873
Sivutch	150	50	150	50	—	—	—	—	—	—
Tolstoi	1,050	204	1,055	276	943	273	1,041	364	1,160	514
Lukanin	178	25	184	60	179	36	196	85	219	110
Kitovi	509	62	512	45	500	79	566	66	558	135
Zapadni	960	237	1,028	287	995	266	978	361	1,061	708
Little zapadni	518	142	498	111	482	122	546	160	651	247
Zapadni reef	142	50	158	60	142	40	163	55	206	80
Grand total	9,304	2,861	9,442	3,152	9,434	3,581	9,318	4,717	9,848	5,912
ST. GEORGE ISLAND										
East reef	113	35	110	35	124	45	152	55	142	27
East cliff	222	95	217	90	220	70	260	60	287	86
Staraya artil	363	165	386	178	372	195	382	160	408	148
North	571	137	770	141	646	154	724	225	902	176
Zapadni	274	68	262	70	257	45	274	70	286	136
South	202	52	214	60	206	40	191	35	260	253
Grand total	1,745	552	1,959	574	1,825	549	1,983	605	2,285	826

	1954		1955		1956		1957		1958	
	Harem	Idle	Harem	Idle	Harem	Idle	Harem	Idle	Harem	Idle
ST. PAUL ISLAND										
Gorbatch	908	806	804	923	854	903	872	392	817	702
Ardiguen	102	40	117	70	112	60	131	70	112	60
Reef	1,630	747	1,404	937	1,558	1,165	1,553	802	1,528	1,018
Polovina	280	620	334	810	390	880	363	1,282	384	575
Polovina cliffs	563	375	240	246	637	572	619	651	713	480
Little polovina	269	225	535	506	272	302	248	606	270	555
Morjovi	602	700	550	1,130	612	1,220	675	1,687	756	1,415
Vostochni	1,722	1,172	1,460	1,443	1,512	1,250	1,553	1,957	1,653	1,615
Sivutch	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tolstoi	1,123	705	1,099	645	1,096	687	978	746	1,058	888
Lukanin	207	130	198	192	196	240	211	213	206	240
Kitovi	539	170	520	188	516	122	547	71	557	190
Zapadni	1,093	795	957	1,055	970	1,022	987	812	1,073	897
Little zapadni	644	230	603	355	527	338	606	365	596	390
Zapadni reef	224	132	213	150	132	255	239	406	247	485
Grand total	9,906	6,847	9,304	8,650	9,384	9,016	9,562	10,060	9,970	9,510
ST. GEORGE ISLAND										
East reef	135	87	139	122						
East cliff	331	221	278	330						
Staraya artil	293	315	785	455						
North	252	160	390	440						
Zapadni	396	290	304	380						
South	821	238	234	175						
Grand total	2,228	1,311	2,130	1,902						

(From "Aldska fur-seal investigations, Pribilof Islands, Pribilof" for 1954–1959. Counts were not made on St. George Island since 1956.)

fitting this increase to a straight line, the following equation is obtained:

$$Y = 931X + 10{,}827$$

where Y is the total number of bulls counted in the Xth. year from 1949. The sharp increase in the idle bull number together with higher idle index in these years suggests that a more extensive kill of the bachelor group would be possible without reducing the actual potential reproduction of males even if the present level of female population is required to be maintained. Further consideration on this point is given in Section 10.

B. Commercial kill size

Commercial killing on the Pribilofs was not carried out from 1911 to 1917, but reopened in 1918. Since then, the method applied to the land killing has been remained uniform year after year with some minor exceptions. Except for several years since 1956[1], the bachelor group measuring 41–45 inches[2] in body-length[3] has been subjected to the commercial kill. The reason of this selective kill is: Males are in excess in natural condition because of their polygamous behavior (refer to Section 4). Since the surplus males do not participate in production activity, the reduction of males to certain extent does not produce any unfavourable effect on the resulting pup production. In the case of Robben Island, it is believed that more surplus males cause a higher mortality rate among the pup group. Since bachelor males land segregatively on the bachelor grounds, adjacent to rookeries, they are easily driven out to the killing field without disturbing harems. The pelages obtained from this group of seals are rather uniform in size and quality.

The commercial sealing season begins about from 22–27 June and ends not earlier than 27 July every year. There are five major rookeries on St. Paul Island, namely North East Point, Polovina, Reef, Tolstoi-Lukanin-Kitovi[4] and Zapadni. These rookeries have bachelor grounds nearby. Sealing operation is rotated from one rockery to another. One rookery group is covered in a day. Therefore, it takes five days to go through five rookery groups. One rotation period, that is five days, is called "round". Killing operation starts very early in the morning. A crew surrounds the bachelor ground and then drive the collected group carefully inland from the beach. From the collected group, a small contingent of about fifty seals is further driven out by turns to the area where clubbers are waiting, holding a wooden club of more than two meters in length. Clubbers hit the head of the seal. They are instructed to kill only seals measuring 41–45 inches. Measurement is estimated by eye. All of the under or over-sized seals are escaped. When a given bachelor ground is covered on a certain day, all seals of the commercial size landing there are killed. Therefore, all seals subjected to killing at the next round are bachelors newly arrived for five days after the last operation. Since the sealing method up to this time has remained uniform both in sealing season and in area covered, the number of bachelor seals killed during a season is supposed

1) From the 1956 season and on, quite a number of cows has been killed in order to reduce the cow abundance for experimental purpose.
2) 41–45 3/4 inches since 1951.
3) Body-length applied for commercial kill is from the tip of snout to the base of tail in the nearest inch.
4) Tolstoi rookery is separated from the Lucanin-Kitovi by hill, but they are expediently treated as a combined rookery because of very close location.

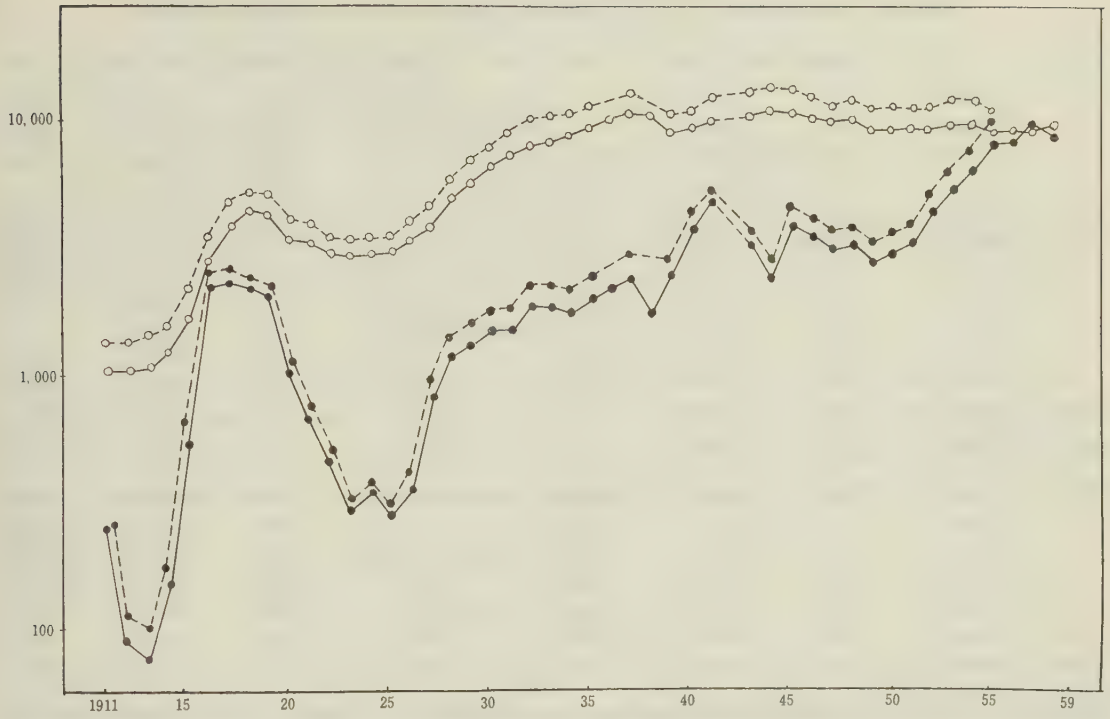


Figure 1. Number of harem and idle bulls counted on the Pribilofs

--○---○--: Harem bulls on the Pribilofs
—○——○—: Harem bulls on St. Paul
--●---●--: Idle bulls on the Pribilofs
—●——●—: Idle bulls on St. Paul

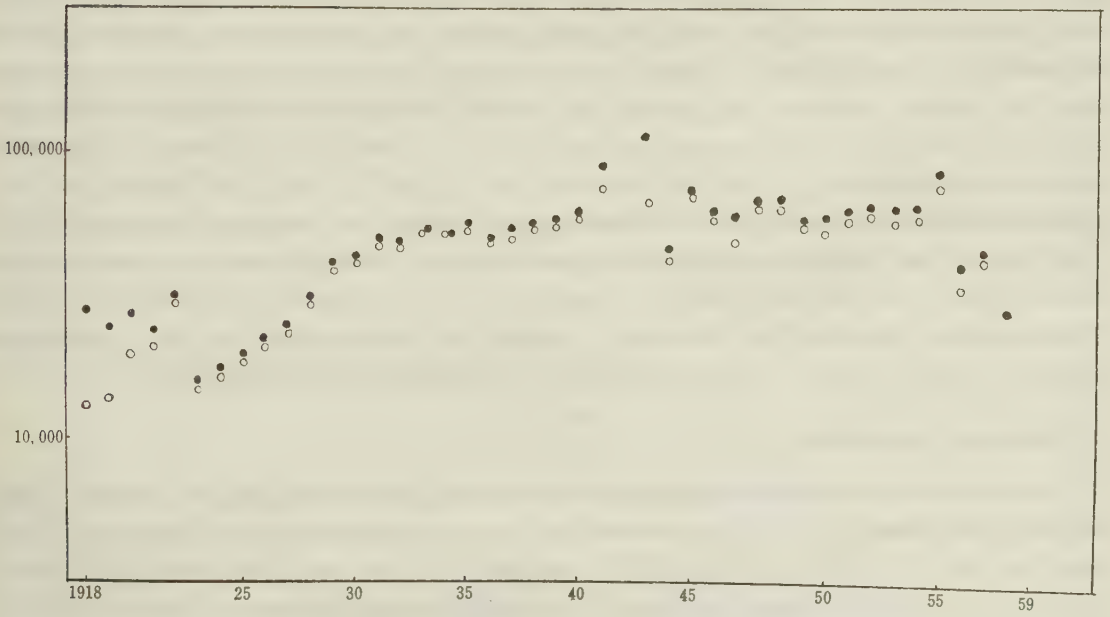


Figure 2. Catch statistics on the Pribilofs

Number of total males killed is represented by black circle and that of group three killed by white circle.

Table 3. Seals killed, 1918–1958, by field measurement in inches, Pribilofs.

Year	41″ to 45-3/4″	Female	Male total	Total	Year	41″ to 45-3/4″	Female	Male total	Total
1918	12,945	—	27,503	—	1939	56,520	161	60,312	60,473
19	13,577	—	24,003	—	40	59,945	323	64,940	65,263
20	19,376	80	26,568	26,648	41	76,136	2,211	92,802	95,013
21	20,567	76	23,605	23,681	42	—	—	—	—
22	30,002	93	31,063	31,156	43	68,189	757	116,407	117,164
23	14,753	204	15,716	15,920	44	43,267	119	47,533	47,652
24	16,411	166	17,053	17,219	45	71,286	573	76,391	76,964
25	18,337	110	19,750	19,860	46	58,780	495	64,028	64,523
26	20,557	96	22,035	22,131	47	49,911	294	61,153	61,447
27	23,305	30	24,912	24,942	48	64,784	249	69,893	70,142
28	29,276	60	31,039	31,099	49	64,308	337	70,653	70,990
29	38,845	45	40,023	40,068	50	56,124	279	59,925	60,204
30	41,409	51	42,449	42,500	51	53,820	186	60,503	60,689
31	47,767	62	49,462	49,524	52	58,999	252	63,670	63,922
32	47,625	104	49,232	49,336	53	60,781	845	65,824	66,669
33	52,747	79	54,471	54,550	54	56,667	658	63,224	63,882
34	51,935	60	53,408	53,468	55	57,869	726	64,727	65,453
35	54,890	235	57,061	57,296	56	85,570	25,136	96,873	122,009
36	49,566	219	52,227	52,446	57	40,215	47,423	46,244	93,667
37	50,800	170	55,010	55,180	58	44,122	31,059	47,860	78,919
38	54,140	199	58,165	58,364	Total	1,809,501	114,222		2,130,578

(Figures are from the personnel correspondence from Mr. Wilke, in charge of U.S. fur-seal research, of U.S. Fish and Wildlife Service. No commercial kill was made in 1942, due to evacuation of Pribilofs because of the war.)

to represent relative strength of the total bachelor group in that year. In other words, the exploitation effect has been almost constant throughout a period of years. Catch statistics on the Pribilofs since 1918 is given in Table 3 and Figure 2. As the majority of the catch is of group III[1], the change in the group III catch may be considered to represent that in the total kill. As is shown in Figure 2, the group III catch increased sharply since 1918 when the sealing operation had started, up to 1922. But in 1923, it dropped to about half the level of the 1922's. It increased again steadily until about 1935 after which it fluctuated around 60,000 individuals. Since 1955, however, the group III catch has progressively decreased again to the latest year. Considering the continuous increase of pup-production from 1914 and on, the sharp drop of yield to a lower level from 1923 must be caused by some drastic change in the mortality rate in younger stage or in the availability of bachelor seals. The progressive decrease from 1956 may be largely due to higher mortality of younger seals because of higher density. These points will be considered in the later section.

C. Evaluation of statistics

On the basis of the increase in both the number of harem bulls and the commercial kill size since 1924, Kenyon *et al* (1954) assume that the growth trend of the Pribilof seal herd in earlier years was logistic, although the parameters of the curve is not given in the paper. Plotting on a graph, the growth trends fit to a logistic curve very well. The logistic equation is written as:

1) Bachelor seals of 41–45 inches in body-length is called "group III".

$$N_t = \frac{K}{1+e^{-r_m t+a}}$$

where

N_t is the number of animals in time t,

K is the asymptotic value which N approaches as t approaches infinity,

r_m is the innate capacity of increase, a is a constant.

Fitting these series of figures to a sigmoid curve, the Author obtained the following equation. (On the basis of the number of harem bulls)

$$N_t = 12{,}300/(1+e^{-0.269t+1.158})$$

where N_t is the number of harem bulls in year t and the unit of t is a year.

Data used to the calculation are of those from 1924 to 1935. The mean from 1945 to 1951 when the values level off, that is 12,300 harem bulls, is considered as the maximum, K. This equation indicates that the maximum annual increment is observed when t is 4.3 years, that is around 1927–28.

(On the basis of the number in the group III catch)

$$N'_t = 59{,}000/(1+e^{-0.265t+1.188})$$

where N_t is the number of group III seals killed in year t and the unit of t is a year. Data involved are those from 1924 to 1939. K is considered as 59,000, the mean from 1943 to 1951. In this case, the maximum increment is observed when t is 4.5 years, that is around 1927–28.

One may notice that the parameters of those two equation are quite identical. The values of r_m (innate capacity of increase), in particular, are in very good agreement. Furthermore, these values of r_m accord well with 0.27 which is calculated by Aikawa (1942) for the Robben Island seal herd. Remarkable agreement in these values are inclined to give an impression that the growth pattern in the seal herd would be logistic. However, some important questions concerning conclution should be raised.

1. The values of r_m obtained are too high.

The relationship between r_m and Ro (net reproduction rate) is approximately represented by the following equation when the population has a stable age-composition.

$$Ro = e^{r_m T}$$

where T is the mean length of a generation. Hence,

$$T \fallingdotseq \frac{\sum lx \cdot mx \cdot x}{\sum lx \cdot m_x}$$

where l_x is the proportion of individuals alive at the beginning of the age-interval for any particular age-group of pivotal age x, and m_x is the number of female birth for any particular parental age-group of pivotal age x.

Putting 0.27 as the r_m value, the approximate value of Ro is about 15.0 and 3.8 when T is 10 and 5 years, respectively. Although no reliable age-composition of the seal herd is yet known, the mean duration of a generation of females must be around 10 years. It is

Table 4. Relationship among r[1], m[2] and the survival rate up to age 5 when the pregnancy rate is 0.80.

a. In the case when the reproductive duration is from age 5 up to age 15.

m / $1+r$	1.02	1.04	1.06	1.08	1.10	1.15	1.20	1.25
0.03	0.320	0.380	0.455	0.540	0.634	0.928	1.320	>1.0
0.04	0.335	0.400	0.475	0.565	0.660	0.950		
0.05	0.348	0.420	0.495	0.583	0.685	0.997		
0.06	0.365	0.435	0.515	0.608	0.714	1.031		
0.07	0.383	0.455	0.540	0.633	0.740			
0.08	0.400	0.473	0.560	0.655	0.768			
0.09	0.415	0.493	0.585	0.680	0.796			
0.10	0.435	0.515	0.605	0.708	0.824			
0.12	0.468	0.558	0.650	0.758	0.882			
0.14	0.510	0.610	0.703	0.818	0.941			
0.16	0.550	0.645	0.753	0.870	>1.0			
0.18	0.595	0.698	0.805	0.930				
0.20	0.640	0.745	0.860	0.988				

b. In the case when the reproductive duration is from age 5 up to age 20.

m / $1+r$	1.02	1.04	1.06	1.08	1.10	1.15	1.20	1.25
0.03	0.245	0.303	0.374	0.456	0.548	0.839	1.236	>1.0
0.04	0.262	0.324	0.395	0.480	0.578	0.879		
0.05	0.278	0.346	0.420	0.506	0.606	0.918		
0.06	0.296	0.364	0.443	0.535	0.639	0.957		
0.07	0.316	0.387	0.470	0.562	0.670			
0.08	0.334	0.408	0.493	0.589	0.700			
0.09	0.354	0.430	0.520	0.617	0.732			
0.10	0.376	0.456	0.544	0.647	0.764			
0.12	0.417	0.503	0.599	0.707	0.829			
0.14	0.463	0.554	0.655	0.769	0.896			
0.16	0.509	0.604	0.713	0.830				
0.18	0.558	0.660	0.769	0.896				
0.20	0.608	0.714	0.829	0.959				

[1]; r represents the rate of annual increase of pup production.
[2]; m represents the annual mortality rate of seals over age 5.

impossible to expect such a high value as the net reproduction rate in a mammal population such as of fur-seal or of whale which does not produce more than one pup in a year. If a simple model is made up under the condition that a population has a stable age-composition with a constant increasing rate in the annual pup-production (r), and that the reproductive duration of the female is from age 5 to 15 or 5 to 20 during which a constant annual mortality rate (m) operates and the pregnancy rate (0.80) is also constant regardless of age, the survival rate up to age 5 which is required to keep a given increase in pup-production can be figured out in response to every possible value of m. The result of these calculations are listed in Table 4 (a, b). Table 4-a shows, for instance, that the survival rate up to age 5 should be, say, 0.320 to realize 1.02 in the $1+r$ value when m is 0.03. The survival rate until age 5 should become higher by the increase of the m value to allow a given value of r. And

at a certain point, the annual mortality rate in year classes less than age 5 exceeds that in older classes. These points are indicated in the table by a thick solid line. It is believed, as is discussed in the later section, that the annual mortality rates up to age 5 are much higher than those in older classes so that figures underneath the line are unreal. According to Table 4-a, no more than 15 per cent increase in pup production can be expected even if mortality up to age 5 is nil. These tables clearly show that the annual increment in pup production must be less than 10 per cent. Therefore, the sharp increase both in the number of harem bulls and the commercial kill size calculated from the sigmoidal curve given above does not represent a real potential growth of the fur-seal herd.

2. The number of pups counted on the Pribilofs from 1914 to 1922 showed only about an 8 per cent increase annually in pup production for that period (see Section 9).

Therefore, the sharp increase in the commercial kill size must originate from other causes such as a gradual increase in the survival rate from the pup to the bachelor stages since 1924, or some change has occurred in the availability of the bachelor group.

3. If the maximum annual increment occurred in 1927–28, as is given by the logistic curve based on the number of the group three catch, the annual increment in the number of harem bulls should have been maximum in several years later than 1927–28. The logistic curve, however, figured out from the number of harem bulls shows the maximum increment in 1927–28.

Judging from these points, as stated above, two series of statistics available do not represent dependably the trend in the growth pattern of the herd.

3. ESTIMATION OF PUP PRODUCTION FROM TAG RECOVERY RESULTS

Extensive tagging of fur seal pups has been continued on St. Paul Island since 1947. The detailed description on the devices used in the tagging operation is given by Scheffer (1950-a). The number of tags applied by each season is listed in Table 5. Since the commercial kill is limited to three and four year old bachelors, tag-recoveries are made three or four years after the liberation of tagged pups. Because of the slight injury caused by tagging operation, Scheffer (1950-a) considers that the mortality caused by putting tag may be almost nil. In order to calculate the tag-lost ratio, some check marks have been applied besides monel metal tags.

For estimating the total abundance of animal, in general, by means of the single census marking experiment the Petersen's method is applied or some others which are more or less modified from Petersen's method such as Bailey's (1951) or Chapman's (1952). As Ricker (1958) pointed out, Petersen's method is properly applicable only in some conditions. In the case of estimating pup abundance on St. Paul Island, (Pribilof Islands) simple estimation by the Petersen's must involve an error because fur-seals never land on the breeding island in a random pattern with regard to the rookeries when they are subjected to the commercial kill after three or four years and the number of tags applied by rookery is not proportional to the number of pups born there. As is already pointed out by Nagasaki & Matsumoto (1957), bachelor seals have a fairly strong homing tendency causing them to return to their

Table 5. Number of tags applied on the Pribilofs from 1947 to 1956[1]
(From Abegglen *et al*, 1958)

Series of tagging	Year of tagging							
	1947 A	1948 B	1949 CS	1952 E	1953 F	1954 G	1955 H	1956 I
ST. PAUL								
North East point	5,557	0	8,588	4,000	2,300	2,300	11,000	9,200
Polovina	5,040	12,132	7,878	9,200	1,200	1,200	6,000	5,600
Reef	3,214	6,646	3,497	6,000	2,000	2,600	14,000	10,800
L-K-Tolstoi	876	0	0	0	2,600[2]	2,000	9,000	7,600
Zapadni	4,496	754	0	800	2,000	1,900	10,000	3,200
Sub. total	19,183	19,532	19,963	19,979	10,388	10,000	50,000	40,000
ST. GEORGE								
Staraga Artil								1,800
Zapadni								2,400
North Rookery								3,700
East Rookery								2,100
Sub. total								10,000
Total	19,183	19,532	19,963	19,979	10,388	10,000	50,000	50,000
Tag location	Left front flipper	Left front flipper	Left hind flipper	Right front flipper	Left front flipper	Right front flipper	Left front flipper	Right front flipper
Check mark	1/4" hold in hind left flipper	None	None	Tip of digit on right hind flipper sliced off	Top of left front flipper sliced off	"V" notch on right front flipper	Tip of digit on left hind flipper sliced off	Tip of right front flipper sliced off

[1]; D series is omitted because only 1,000 tags were applied.
[2]; Plus 400 G series accidentally used.

native rookeries. This tendency is more conspicuous in female than in male. From the theoretical view point, therefore, the stratified method with consideration given to immigration and emigration among rookeries, is more appropriate for estimating pup abundance. The calculated numbers of pups in a given rookery by this procedure, however, fluctuates largely from year to year. Since the production on a given rookery may be considered to be rather stable[1)] and the year-to-year variation may not be large, the great variation in the estimated values may be from the error caused by the number of samples or sampling techniques.

A. Stratified Method

Strictly speaking, the quantitative intermixing pattern between the Pribilof and other islands where seals breed should be taken into account. Leaving these points out of consideration because no reliable data is still available for them, the following calculation stands on the premise that all the St. Paul born pups return only to St. Paul and no seal being born on other islands immigrates to St. Paul. When tag liberation and tag-recovery are

1) This is supported by the stable distribution of harem bulls (see Table 2) and of commercial kill on a given rookery.

carried out on each of the five rookeries, the following equation is applied:

$$N_i = \sum_{j=1}^{5} \frac{S_{ij}}{t_j} N_j$$

where

N_i is the number of the kill on rookery i,

S_{ij} is the number of recovered tags on rookery i that had been applied on rookery j,

N_j is the number of pups when tagged on rookery j,

t_j is the number of pups tagged on rookery j which originally had a population N_j.

Putting N_j, S_{ij} t_j, the known values, into the simultaneous equations, N_j is obtained. The tag liberation on each of five rookeries on St. Paul Island in a season was carried out in 1947 (A series tag) and in 1953 and on. Estimated values, thus calculated, should be adjusted for animals which have lost tags[1]. Since males of the 1947 year class were subjected to killing for tagged animals in addition to the regular killing when they were three year old, a special correction should be made in estimating pups. For this correction, the factor calculated by Kenyon *et al* (1954), that is 0.7375, is used. The adjusted numbers of pups estimated are given in Table 6.

Table 6. Number of pups on each rookery estimated by the stratified method (adjusted).

Year of tagging	Name of Rookery						Estimated from the kill of
	Zapadni	T. L. K.	Reef	Polovina	N. E. P.	Total	
1950	27,000	79,000	123,000	64,000	100,000	393,000	3 & 4 yrs. male
1953	127,000	135,000	225,000	41,000	185,000	713,000	3 yrs. male
1954	163,000	76,000	193,000	144,000	179,000	755,000	3 yrs. male
1954	103,000	93,000	102,000	135,000	68,000	501,000	4 yrs. female
1955	206,000	183,000	178,000	113,000	218,000	898,000	3 yrs. female
1955	92,000	114,000	187,000	77,000	147,000	617,000	3 & 4 yrs. male
1956	167,000	−73,000	214,000	142,000	167,000	617,000	3 yrs. male

It is noted that the estimated numbers of pups of three year classes from 1953 to 1955, based on tag-recoveries from the three-year-old male group are rather close together, but the 1954 year class strength based on the three-year-old male catch is greatly different from that calculated from the four year old catch. In the case of the 1955 year class, a great difference is also observed between the estimate from three year old males and that from three year old females. It is also noticed that the estimated numbers on a given rookery vary largely from year to year. It is not probable that the annual production of pups on a given rookery varies so greatly in a short period. As the estimation is made on each rookery by the stratified method, the sample size becomes smaller and the sampling error is accumulated. A reliable estimate by this procedure would only be obtained from sample larger than that presently taken.

Because of the homing tendency of this animal, each rookery should be considered separately in order to study various ecological aspects of seals. For this purpose, pup produc-

1) Tag-lost ratio is calculated from comparison between the number of recovered tags and that of animals which are identified by check-mark but have lost their tag.

tion on each rookery should be calculated.

B. Petersen's Method

Theoretically speaking, as mentioned above, the estimation of pup abundance on St. Paul Island is more accurately calculated by the stratified method than by Petersen's method. When the stratified method is applied, a larger sample size may be required to obtain a reliable estimate. Applying Petersen's method, on the other hand, the over-all combined sample for several years is available for making the estimate and the sample size becomes larger. Also, when it is applied, estimates for a longer period are possible, that is, from 1947 when extensive tagging on this island was started. At the present stage, therefore, estimation by Petersen's method is considered to be more appropriate.

For the Petersen's type estimation, Chapman's method (1952) is used in the present study, namely:

$$N=(n+1)(t+1)/(S+1)$$

where

N is the number of pups at the time of tagging,

n is the number of seals killed,

t is the number of pups tagged,

S is the number of tagged seals recovered.

The size of n was estimated from the age-composition of a sample taken from the commercial kill. S in the above equation should be corrected for the lost tags. Observed values of n, t, S_1 and S_2 (S_1 is the number of tags actually recovered and S_2 is the corrected value for lost tags) by age and sex from E to H series together with the calculated value of N are tabulated in the following table (Table 7).

Table 7. Estimation of pup abundance by Petersen's method.

Year class	Tag series	Age & Sex	n	t	S_1	S_2	$(n+1)(t+1)/(S+1)$
1952	E	5 yrs. F.	9,373	19,979	487	536	349,000
		4 yrs. M.	31,448	〃	1,219	1,425	441,000
		4 yrs. F.	4,795	〃	204	262	364,000
		3 yrs. M.	30,733	〃	1,057	1,197	580,000
1953	F	4 yrs. M.	8,855	10,400	115	129	708,000
		4 yrs. F.	4,551	〃	100	113	415,000
		3 yrs. M.	38,290	〃	582	622	640,000
		3 yrs. F.	1,601	〃	37	11	397,000
1954	G	4 yrs. M.	5,599	10,000	81	94	589,000
		4 yrs. F.	6,736	〃	127	137	492,000
		3 yrs. M.	23,473	〃	315	325	720,000
		3 yrs. F.	953	〃	27	32	289,000
		2 yrs. M.	2,859	〃	41	42	665,000
1955	H	3 yrs. M.	27,863	50,000	1,959	2,188	636,000
		3 yrs. F.	9,762	〃	526	551	812,000
		2 yrs. M.	1,015	〃	122	125	403,000

It is noted in the calculated values of N that an appreciable variation is observed in several

cases even if of a given year class. This is particularly so in G series in which S_2 values are smaller. N is estimated more accurately, therefore, from the combined data of several years and both sexes. The estimations, thus obtained, are given below:

Tag series	Estimated number	In 95 per cent confidential limit	
		Upper limit	Lower limit
E	446,000	460,000	432,000
F	613,000	650,000	575,000
G	628,000	674,000	582,000
H	674,000	700,000	651,000

Since the detailed data on the tag recovery results from A to D series are not available, particularly for the special correction that should be made in A and B series recoveries because a selective kill for tagged animals regardless of their size was made in the 1950 and 1951 seasons, the estimates of these year classes are cited from Chapman (1957). The method of calculation made by Chapman is quite similar to that used herein. In the 1956 and thereafter, tagging has been carried out both on St. Paul and St. George Islands. The latest recovery result now available in this moment is that of the 1956 year class from the catch in the 1958 and the 1959 seasons. Tag recoveries and the corresponding catch in these two years are listed below:

Year of recovery	Rookery of recovery	Rookery of tagging		Tag-lost	Corresponding catch	Age
		St. Paul	St. George			
1959	St. Paul	421	37	61	10,671	3 yrs. male
	St. George	23	54	22	2,251	〃
1958	St. Paul	83	12	4	875	2 yrs. male
	St. George	15	24	6	171	〃

In this case, pup abundance both on St. Paul and St. George can be estimated by means of the stratified method. The result of calculation is:

	St. Paul	St. George	Total
From the 1959 kill	809,000	241,000	1,050,000
From the composite of the 1959 and 1958 kills	758,000	159,000	917,000

Apart from the estimation of the 1956 year class, all others involve the common error caused by the immigration of seals from St. George to St. Paul. This correction factor, if it is presumed to be constant from year to year, is calculated from the recovery result of the 1956 year class. Applying Petersen's method to St. Paul only, as is comparable to the estimated N of other year classes, 820,000 is obtained as the abundance of the 1956 pup class. Hence, 758,000/820,000 or 0.925 is the correction factor. The proportion of pup produced on St. Paul has been estimated as 83 per cent of the total Pribilof production. This is based on comparisons in the number of harem bulls counted and the kill for the same season on St. Paul and St. George (Kenyon *et al*, 1954). This assumption is quite acceptable because the number of pups on St. Paul calculated from the 1958 and the 1959 tag recoveries, applying the stratified method is about 82 per cent of that on all Pribilof. Hence, the total

number of pups on the Pribilofs is given as the number of pups on St. Paul divied by the factor, 0.83.

The final estimations, thus calculated, of the number of pups at the time of tagging on St. Paul and all Pribilof are listed below:.

Table 8. Final estimation of the number of pups at the time of tagging.

	On St. Paul	On all Pribilof
1956 year class (I series)	758,000	917,000
1955 〃 (H 〃)	623,000	751,000
1954 〃 (G 〃)	581,000	700,000
1953 〃 (F 〃)	567,000	683,000
1952 〃 (E 〃)	412,000	496,000
1951 〃 (D 〃)	429,000	517,000
1949 〃 (CS 〃)	421,000	507,000
1948 〃 (B 〃)	394,000	475,000
1947 〃 (A 〃)	400,000	482,000

Given above is the number of pups at the time of tagging by season but not that at the time of birth. Tagging has been carried out for several days at the end of August and the beginning of September, almost two months later than the pup's birth. During this two months period, a considerable number of pups die from hook-worm infection and some other causes (see Section 7). The number of pups born, therefore, is the sum of the estimated number from tagging result and the number of dead pups counted on the island. The estimated production thus obtained are given below:

Table 9. Estimated number of pups at the time of birth.

	On St. Paul	On all Pribilof
1956 year class	862,000	1,037,000
1955 〃	702,000	—
1954 〃	682,000	811,000
1953 〃	650,000	775,000
1951 〃	503,000	—

(No dead pups counting in 1955 and 1951)

As is demonstrated by Table 4 of Section 2, it is impossible to expect more than 10 per cent annual increase in pup production in a population such as of fur-seal which does not produce more than one pup a year. Even in the earlier years, that is from 1912 until 1924, when the population density on the Pribilofs was still at a low level, the observed annual increment in pup production was about 8 per cent. Therefore, the sharp increase in these years is quite incomprehensive under constant parameters. The Author considers that some drastic change might have occurred in the parameters such as the mortality of young seals in these years.

4. SEGREGATIVE DISTRIBUTION AND INTERMIXTURE AMONG DIFFERENT ORIGINS

A. Segregative Distribution

a. On land

Fur-seals form a conspicuous mating group called a " harem " during the breeding season. Being incidental to this reproductive behavior, the group of seals participating in reproduction is isolated from other groups such as young males or older, exhaused bulls. On the harem ground, called a rookery, assemble active mature bulls (harem bull) and reproductively mature femals accompanied by black pups. The bachelor ground, adjacent to a rookery, is occupied mostly by the immature or younger males. Old exhausted bulls may rest in isolated places. As the result of this segregative distribution on the breeding ground, the catch composition, even if it is taken at random, does not necessarily represent the real composition of the seal herd. It is also possible that some group of immature seals which are not interested in reproduction do not land on the island because seals depend on land only for their reproductive and nursing acts. Some bachelors, 41 to 45 inches in length, are subjected to commercial kill on land. This group is comprised mostly of three and four year old

Table 10. Age-composition of female kill (From Abegglen et al, 1957).

St. Paul, 1957 (Harem drive).

Period of kill	Estimated number killed from each age class									
	3	4	5	6	7	8	9	10	10_+	Total
27 June— 1 July	—	3	33	39	35	25	14	6	7	162
2 July — 6 〃	—	5	39	68	57	48	28	10	11	266
7 〃 —11 〃	—	—	116	155	142	96	48	21	32	610
12 〃 —16 〃	—	6	67	67	123	89	72	41	19	484
17 〃 —21 〃	—	16	97	132	104	73	39	15	44	520
22 〃 —26 〃	2	32	204	204	131	81	77	19	90	840
27 〃 —31 〃	22	79	344	257	173	139	88	64	418	1,584
1 Aug.— 5 Aug.	133	413	1,043	725	409	356	464	193	1,228	4,976
6 〃 —10 〃	157	937	1,923	857	640	611	578	326	1,943	7,978
11 〃 —15 〃	356	1,558	2,907	1,212	877	897	682	388	2,821	11,725
16 〃 —20 〃	283	1,502	2,600	1,031	510	465	509	306	1,203	8,409
Season total	953	4,551	9,373	4,747	3,201	2,880	2,599	1,389	7,816	37,554

St. George, 1957 (Bachelor ground drives).

10 July —31 July	Omitted because of few number									
1 Aug.— 5 Aug.	12	149	151	134	80	64	69	67	239	965
6 〃 —10 〃	41	307	367	276	176	108	101	78	365	1,825
11 〃 —15 〃	46	286	877	619	320	313	189	114	864	3,628
16 〃 —20 〃	97	497	673	554	245	182	153	122	805	3,334
Season total	197	1,249	2,092	1,596	830	670	521	384	2,309	9,859

(Underlined numerals represent the kill of the dominant age class).

males and includes few yearling or two year old seals. The proportion of four year old seals in the catch decreases as the season progresses during July and August, while that of three year old increases. This suggests that younger seals land on the island later and some of them possibly do not land on the island at all. This suggestion is supported by the finding that many yearlings and two year old male seals are observed at sea in the northern part of the Pacific during the breeding season. Also no evidence has been obtained to prove that all three and four year old males land on the island each season.

In examining the age-composition of the female kills on the Pribilofs made in 1956 and 1957, the following points are to be noted. In the 1957 female kill made from the harem ground drive on St. Paul Island, six year old seals are dominant until around 20 July, while five year old class takes a dominant place later on (see Table 10). The over-all age-composition

Table 11. Age-composition of female kill in fall season, St. Paul, 4–8 Sept., 1956 in term of percentage. (From Abegglen et al, 1956).

Date of kill	Age										Number of kill
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	10_+	
4 Sept.	7	25	23	10	7	3	5	2	—	18	519
5 〃	1	11	32	19	12	7	10	—	2	6	520
6 〃	5	9	29	26	13	5	5	1	—	7	399
7 〃	6	18	28	12	8	8	1	4	3	12	479
8 〃	9	22	26	13	6	7	4	4	3	6	426
	5	17	28	16	9	6	5	2	2	10	2,343

(Underlined numerals represent the kill of the dominant age class).

from 27 June to 20 August is overwhelmingly dominated by the five year old class. On the other hand, four year old seal increases during the season and is predominant, according to the 1956 catch, in September (Table 11). It may be concluded, therefore, that, as in the case of male, the young females land later and some animals younger than three years old might not land on the island at all.

b. On Sea

As a very complicated segregative distribution is observed in the pelagic life of fur-seals, the composition of the pelagic kill does not necessarily represent the real composition of the seal herd. These segregative habits both on land and on sea make the fur-seal population study rather difficult.

Catch compositions, in term of percentage, of the pelagic kill in various waters are listed in the following tables (Tables 12, 13, 14, 15, 16).

The pelagic catch of seal may be considered to be non-selective except that chasing older males is time-consuming and hunting them is rather difficult. The sealing season when samples were collected is January-July off Japan, February-July off Alaska, February-July off British Columbia, April off Oregon-Washington and February-April off California. Although segregative distribution of this animal seems to be very complicated, as revealed, by Figure 3, the following points may be noticed.

Table 12. Age-composition of the catch off Japan in term of percentage.

Age	1952[1]		1958[2]		1959[3]		1960[4]		Total		
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Total
1	3.7	1.0	2.0	0.9	4.0	2.1	1.7	0.7	3.0	1.3	4.3
2	16.0	9.7	15.3	7.6	13.2	9.3	14.5	9.9	14.8	9.0	23.8
3	12.3	12.4	22.2	17.1	11.7	13.7	13.6	11.6	15.5	14.2	29.7
4	5.0	10.8	4.6	8.7	10.1	11.0	3.9	11.5	6.2	10.3	16.5
5	1.5	7.5	1.4	7.1	2.0	6.6	2.0	11.1	1.7	7.6	9.3
6	0.2	4.1	0.7	3.7	0.6	4.4	0.4	7.0	0.5	4.5	5.0
7	0.1	3.2	0.5	2.0	0.3	2.6	0	4.5	0.3	2.8	3.1
8	0.1	2.3	0	1.2	0	1.6	0	2.4	0.1	1.8	1.9
9	0	2.1	0	1.0	0	1.0	0	1.5	0	1.3	1.3
10	0	2.7	0	0.6	0	0.7	0	0.7	0	1.1	1.1
10_+	0.1	4.4	0	3.4	0	4.8	0	3.0	0	4.0	4.0
Total	39.0	60.2	46.7	53.3	41.9	57.8	36.1	63.9	42.1	57.9	100.0
Number of sample	2,329		2,982		2,806		1,405		9,522		9,522

1) From Taylor et al (1955).
2) From Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, 1959-a.
3) From Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, 1959-b.
4) From Nagasaki et al (1960).

Table 13. Age-composition of the catch off California in term of percentage.

Age	1952[1]		1958[2]		1959[3]		Total		
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Total
1	2.0	0	0	0	0.1	0.2	0.3	0.1	0.4
2	0	0.5	0	0.4	0.2	1.4	0.2	1.1	1.3
3	0	3.0	0	3.7	0.3	2.3	0.2	2.7	2.9
4	0	5.0	0	3.9	0.4	6.3	0.3	5.6	5.8
5	0	5.5	0	8.3	0	7.6	0	7.6	7.6
6	0	5.0	0	8.7	0	8.6	0	8.3	8.3
7	0	7.0	0	9.3	0	10.3	0	9.7	9.7
8	0	9.6	0	8.3	0	10.3	0	9.7	9.7
9	0	8.1	0	6.1	0	7.2	0	7.0	7.0
10	0	3.5	0	8.5	0	6.8	0	6.9	6.9
10_+	0	49.8	0	42.8	0	37.8	0	40.3	40.3
Total	2.0	97.0	0	100.0	1.0	98.8	1.0	99.0	99.9
Number of sample	199		460		1,242		1,901		1,901

1) From Taylor et al (1955).
2) From Wilke et al (1958).
3) From Niggol et al (1959).

a) Male seals occur scarcely in the waters off Washington-Oregon-California. The majority of the catch there is comprised of older females. The frequency of male occurrence is apparently increases in conformity with latitude, as 1.0 per cent off California, 7.6 Oregon-Washington, 19.8 off British Columbia and 23.3 off Alaska.

b) Age-composition of the female catch off the Mainland of North America indicates that the frequency of young females is significantly lower than that of older one. This suggests

Table 14. Age-composition of the catch off Oregon-Washington in term of percentage.

Age	1952[1]		1958[2]		1959[3]		Total		
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Total
1	3.0	4.0	5.1	11.8	3.6	4.7	3.9	6.4	10.3
2	0	2.0	0.7	0.7	2.5	5.7	1.5	3.7	5.2
3	1.0	4.0	0.7	8.8	1.8	5.0	1.4	5.8	7.2
4	0	15.2	1.4	5.9	0.4	5.4	0.6	7.4	8.0
5	0	4.0	1	4.4	0	6.8	0	5.7	5.7
6	0	7.1	0	7.4	0	4.0	0	5.5	5.5
7	0	6.1	0	8.1	0	5.4	0	6.2	6.2
8	0	11.1	0	5.1	0.4	12.9	0.2	10.5	10.7
9	0	7.1	0	11.1	0	6.8	0	8.0	8.0
10	0	6.1	0	5.1	0	4.0	0	4.7	4.7
10_+	0	29.3	0	23.5	0	30.6	0	28.5	28.5
Total	4.0	96.0	7.9	91.9	8.7	91.3	7.6	92.4	100.0
Number of sample	99		136		278		513		513

1) From Taylor et al (1955).
2) From Wilke et al (1958).
3) From Niggol et al (1959).

Table 15. Age-composition of the catch off British Columbia in term of percentage.

Age	1958[1]		1959[2]		Total		
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Total
1	13.7	24.6	15.5	18.6	14.4	22.3	36.7
2	2.5	5.1	4.8	5.8	3.3	5.4	8.7
3	1.6	7.4	0.7	1.4	1.3	5.1	6.4
4	0.6	6.3	0	4.5	0.4	5.6	6.0
5	0.4	5.5	0	7.6	0.3	6.0	6.3
6	0	4.5	0	8.9	0	6.2	6.2
7	0	5.0	0	8.2	0	6.3	6.3
8	0	3.3	0	6.2	0	4.4	4.4
9	0	3.3	0	6.2	0	4.4	4.4
10	0	1.4	0	1.4	0	1.4	1.4
10_+	0	15.0	0.3	9.9	0.1	13.1	13.1
Total	18.8	81.2	21.3	78.7	19.8	80.2	100.0
Number of sample	488		291		779		779

1) From Pike et al (1958).
2) From Pike et al (1959).

that young females seldom migrate so far south. Therefore, the mortality rate calculated from the age-composition of the female catch taken off the mainland may not be fully reliable.

c) Except the waters off British Columbia and the northern Pacific, yearling seals, the most abundant age class, are hardly taken. This tendency, together with finding from tag-recovery results that almost no yearling seals of Pribilof origin migrate to the waters off Japan, suggests that distribution ranges of yearling and two-year-old groups are mostly limited to

Table 16. Age-composition of the catch off Alaska in term of percentage.

Age	1952[1]		1958[2]		Total		
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Total
1	0	0	2.4	1.6	1.7	1.2	2.9
2	6.7	1.8	0.1	0.1	2.2	0.7	2.9
3	20.6	5.2	6.3	1.1	11.3	2.5	13.8
4	4.9	14.2	2.3	1.8	3.2	5.9	9.1
5	0.5	3.4	0.2	2.9	0.3	3.2	3.5
6	0.3	8.2	0.7	5.5	0.6	6.7	7.3
7	0	4.9	2.0	5.5	1.5	5.8	7.3
8	0	6.4	1.6	6.4	1.2	6.8	8.0
9	0	3.1	0.8	4.3	0.6	3.7	4.3
10	0	4.6	0.3	5.8	0.3	4.5	4.8
10_+	0	15.2	0.6	47.8	0.4	35.7	36.1
Total	33.0	67.0	17.3	82.8	23.3	76.7	100.0
Number of sample	388		889		1,277		1,277

1) From Taylor et al (1955).
2) From Wilke et al (1958).

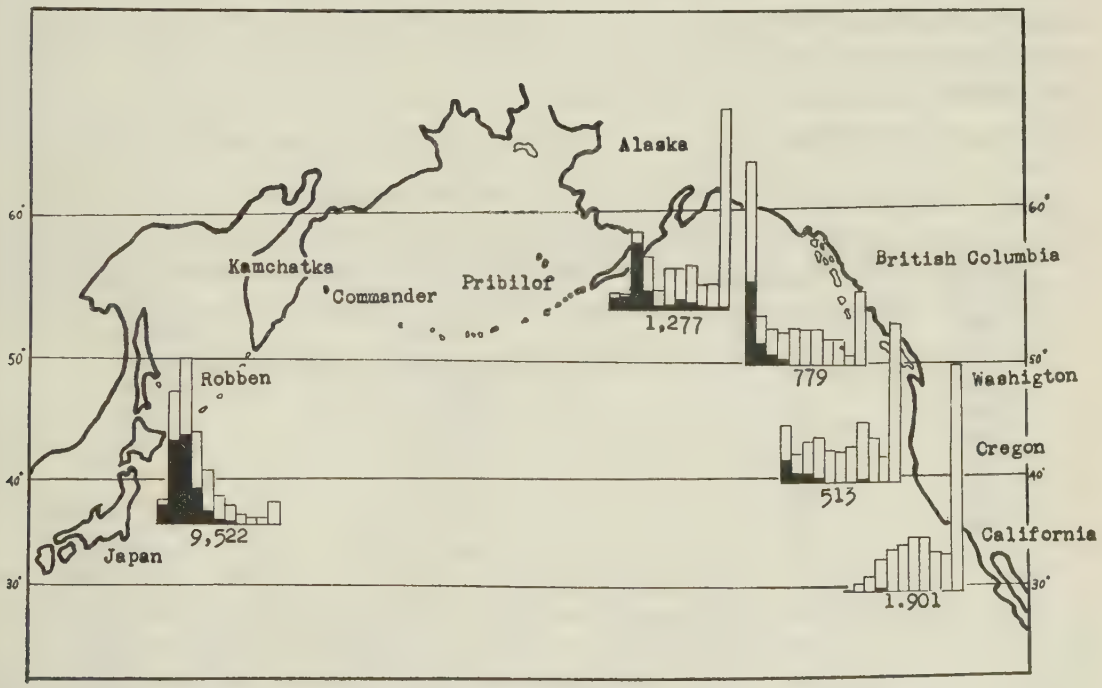


Figure 3. Age and sex composition of pelagic catch in various waters
Male age-composition is shown by black and the female one is by white.

northern waters. Considering that these younger seals are vulnerable to grave mortality, it may easily be perceived that they have different habitat from that of older groups.

d) As far as the male age-composition is concerned, the catches made off Japan and Alaska are very similar and are dominated by two or three year old groups. In case of females,

three year old seals are predominant in both samples. One characteristic of the male age-composition is extremely low frequency of older males.

e) According to the samples obtained in the North Pacific, seals occurring in the summer may be mostly yearlings or two-year-olds which might not land on the breeding island, an accurate sex-ratio for these seals is not yet known.

B. Intermixture among different origins

a. Intermixture in the waters off Japan

One of the major objectives of the fur-seal tagging experiment is the estimation of the intermingling pattern of seals of different origins in the waters off Japan. As is already pointed out, segregation by age and sex is apparent in the fur-seal distribution at sea. Rate of intermixture, therefore, should be calculated by age and sex groups separately. Despite the fact that extensive tagging has been carried out on the Pribilofs since 1947, the number of recovered tags off Japan, when the catch is broken down into each age and sex group, is not large enough to calculate a accurate pattern of intermingling because of small number of samples. The general pattern of intermixture, however, would be suggested by the series of tag-recovery data collected so far. Data used herein are those compiled through pelagic research in the waters off Japan since 1952. Extensive research there has been carried out in 1952, 1958, 1959 and 1960.

Numbers of tags applied by season together with the number of pups alive at the time of tagging on the Pribilofs and the Soviet breeding islands are tabulated as follows:

Table 17. Estimated number of pups and the number of tags applied on the Pribilofs.

Year of tagging	Tag-series	Estimated number of pups at the time of tagging	Number of tags applied
1956	I series	917,000	50,000
1955	H 〃	751,000	50,000
1954	G 〃	700,000	10,000
1953	F 〃	683,000	10,388
1952	E 〃	496,000	19,979
1951	D 〃	517,000	1,000
1949	CS 〃	507,000	19,963
1948	B 〃	475,000	19,532
1947	A 〃	482,000	19,183

Table 18. Number of tags applied on Robben and the Commander Islands.

	1958		1959	
	Robben	Commander	Robben	Commander
Number of pups at the time of tagging	28,813	21,387	29,598	35,215
Number of tags applied	7,225	4,887	9,015	7,971
Tagging rates	0.2507	0.2285	0.3045	0.2263

(Figures were reported to the fur-seal Commission by Soviet scientists.)

The numbers of the recovered tags together with the corresponding catch by age and sex are given in Table 19. The recovery rate on the Pribilofs was adjusted by tag-lost ratio

Table 19. Number of recovered tags and the corresponding catch by age and sex off Japan.

Age	1952		1958		1959		1960	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
1	87	23	63	30	113 (18*, 4**)	59 (7*, 2**)	23 (3*, 1**) (1)	99
2	373	226	487 (4)	236 (4)	370 (7*) (3)	262	200 (23*, 4**) (2)	136 (13*, 2**)
3	286 (5)	289 (1)	711 (29)	547 (8)	329 (5)	385	188 (2*) (3)	160
4	116 (1)	251 (1)	151 (1)	275	284 (14)	309 (3)	54 (1)	159
5	35	177 (2)	46	221 (1)	56	184 (1)	27	153 (1)
6	5	96	22	117 (2)	17	124 (2)	5	97
7	2	74	16	60	7	73	1	62
8	2	54	1	37	3	45	1	33
9	0	48	1	30 (1)	0	29	0	20
10	1	61	0	18	0	80	0	9
10_+	0	102	0	107	0	137	0	41

Numeral in parenthesis is the number of recovered tag. Underlined numeral is of Soviet tag.
Numeral with * mark is of Robben and ** mark is of the Commander.

which is estimated from the check-marked seal without bearing tag. The recovery rate at sea used in the present paper, however is not corrected for the lost tags, because the tag-lost ratio observed on the Pribilofs varies largely both by series and by age. But it is assumed that the tag-lost ratio up to four year old may be less than 20 per cent. The intermingling ratio calculated herein, therefore, must be more or less underestimated, particularly in older ages.

Most of the recovered tags from mature seals are of the Pribilof origin but a number of Soviet tags are collected from the yearling and two year old groups, since extensive tagging on the Soviet breeding islands was started with the 1958 season. Except in the yearling group in 1959 and in the yearling and two year old groups in 1960, therefore, the ratio of intermixture is estimated only from the tag recovery of the Pribilof origin.

Table 20. Intermingling ratio of the Pribilof origin in the waters off Japan by age and sex.

Age	Sex	1952			1958			1959		
		a	b	c	a	b	c	a	b	c
1	Male		0	0		0	0		0	0
	Female		0	0		0	0		0	0
2	Male				26.5	4	0.15±0.13			
	Female				12.8	1	0.08			
3	Male	11.2	5	0.44±0.275	47.3	29	0.61±0.14	17.9	5	0.28±0.21
	Female	11.4		0.09	36.4	8	0.22±0.13		0	0
4	Male				2.1	1	0.47	18.9	14	0.74±0.20
	Female							20.6	3	0.14±0.15
5	Male									
	Female				3.3	1	0.30	2.6	1	0.38
6	Male									
	Female				4.7	2	0.43	1.8	2	1.00

a: Expected number of tags when all seals of a given age and sex come from the Pribilofs.
b: Number of tags recovered.
c: Intermingling ratio.

The rate of intermixture is simply estimated from the actual number of tags recovered divided by the expected number that would be recovered when all of the migrating seals off Japan come from the Pribilofs. The ratio calculated by age and sex is tabulated in Table 20. The ratio in the 1960 season is not calculated as the tagging rate on the Pribilofs in 1957 is not yet available.

Intermixture in yearling group:

Both male and female yearlings occur with low frequency in the catch off Japan. No Pribilof tag was recovered from the yearling group throughout the 1952, 1958 and 1959 samples and only one tag was collected from male seals in the 1960 season. This strongly suggests that the yearling group, both male and female, migrating off Japan originates on the Soviet islands. These are the Robben Island and the Commander Islands origin. Based on the numbers of tags recovered from these two islands and the tagging rates there, intermingling ratio between seals of Robben and the Commander origins can be calculated. The intermingling ratios in both the yearling and in two year old groups are listed in Table 21.

Table 21. Intermingling ratio between seals of Robben and the Commander origins in the waters off Japan.

Year	Age	Male		Female		Combined	
		Robben	Commander	Robben	Commander	Robben	Commander
1959	1	0.804	0.196	0.760	0.240	0.791	0.209
1960	1	0.690	0.310	—	—	—	—
	2	0.840	0.160	0.855	0.145	0.845	0.155
Weighted mean		0.824	0.176	0.820	0.180	0.822	0.178

It is noted in the table that the intermixing ratio between the Robben and the Commander origins in the yearling and two year old group ofl Japan may be roughly 4 to 1. Since almost all of the yearling group are from the Soviet breeding islands, approximately 80 per cent of these year groups of seals migrating off Japan is of the Robben origin and the remainder is of the Commander origin.

Intermixture in two year old group:

The number of Pribilof tags recovered from the two year old class is few in spite of the number of samples collected. Since no tagging was done on the Pribilofs in 1950, no tag recovery is expected from two year old class in 1952. The intermingling ratio in two year old seals in 1958 is 15 per cent for males and 8 for females. Considereing that seals off Japan include almost no Pribilof origin at the yearling stage but an appreciable number of three year old Pribilof seals as mentioned below, the two year old stage appears to be the age when Pribilof seals begin to migrate to waters off Japan. An exact intermingling pattern in two year old group can be calculated after 1960 when extensively applied Soviet tags appear in two year old animals.

Intermixture in three year old group:

The calculated ratio of the Pribilof seals among those in three year old class migrating

off Japan is given below:

	Male	Female
1952	0.45±0.27	0.09
1958	0.61±0.14	0.22±0.13
1959	0.28±0.21	0

It is clearly apparent that the ratio for males is significantly higher than that for females and the ratio for both sexes varies from year to year. As to the year-to-year variation, the ratio observed in 1959 is much lower than that in 1958. Poor survival of the 1956 year class on the Pribilofs (see Section 9) as indicated by poor return as three year old group is accord with the comparatively low frequency of the three year old seals in the catch off Japan in 1959. The poor magnitude of that year class is reflected in the intermingling ratio off Japan.

Intermixture in four year old group:

The tag recovery rate in four year old group in 1959 is very high and the intermingling ratio amounts to 74 per cent for males and 14 per cent for females. This high rate is certainly related to higher rate of survival of seals becoming three years old in 1958.

Intermixture among seals over five year old:

No tags have been collected so far from males five year old group and older, probably because the samples for these year classes are not large enough. In the case of females, however, the calculated intermingling ratio is fairly high, 30 per cent in five year olds and 43 per cent in six year olds in 1958 and 38 in five year olds and 100 in six year olds in 1959, although the number of the recovered tags is few. It is suggested, therefore, that the intermingling ratio increases with age in the case of females. Considering that the pelagic catch off California and Oregon is predominantly occupied by older females, it is assumed that the migration range of mature female seals is wider than that of young one.

It would be concluded that almost all of the yearling seals migrating off Japan originate on Soviet islands. The intermingling ratio between seals of Robben and the Commander origins in the yearling and two year old groups may be roughly 4 to 1. Considereing that the intermingling ratio for seals of Pribilof origin in the two year old group off Japan is not high and that the frequency of yearling in the catch off Japan is much lower than that of two year old class, the yearling seals migrating off Japan are only a part of those being born on the Soviet breeding islands.

It is also noticed that the intermingling ratio of the Pribilof seals increases as age progresses either in male or in female. The ratio is significantly higher in males than in females among seals up to four years old. A ratio for male seals over four years old has not been calculated.

b. Intermixture among different breeding islands

Nagasaki & Matsumoto (1957) reveal that three tendencies are apparently shown in landing of the bachelor seals at a breeding site on the basis of the tag-recovery data obtained on St. Paul Island. The strongest tendency observed is their return to the native site where they were born three or four years earlier. The second noticeable tendency is that the

seals are inclined to land on the most favourable ground where more space is available for them. The weakest tendency is for disperse and return at random to the rookeries.

Since the commercial kill has been confined to the bachelor group, tag-recoveries so far obtained are mostly from young males with few from females. The female movement, therefore, is still unknown except for the finding that older females have stronger homing tendency than young females (Schefter, 1950 a). The finding by Nagasaki *et al* 1957) may suggest that some degree of intermixture may possibly occurr among seals from Robben, the Commander and the Pribilof Islands.

In spite of the fact that a great number of bachelors has been killed and examined for a period of years on the Pribilof Islands, only a single Soviet tag was ever recorded there. It was found in 1958. On the other hand, a number of the Pribilof tags has been collected either on Robben or on the Commander Islands. The number of U.S. tags recovered on the Soviet islands for the 1959 season together with the corresponging catch are tabulated in Table 22.

Table 22. U.S. tag recovery on Robben and the Commander in 1959.

Age	Commander		Robben	
	No. of catch	No. of recovered tag	No. of catch	No. of recovered tag
2	2	0	72	1
3	513	11	1,962	0
4	1,401	31	1,781	9
5	264	0	552	0
6	58	0	135	2

By the same procedure as that used for estimating the intermixing rate at sea, the rates of intermingling between the Soviet and the Pribilof seals on Robbern Island and on the Commander Islands, in the three and the four year old classes, are given in the following table.

Table 23. Intermixing rate between the Soviet and the Pribilof Islands origins on Robben Island and the Commander Islands.

Age	Commander			Robben		
	a	b	c	a	b	c
3	25.7	11	0.42	—	0	0
4	92.4	31	0.30	106.8	9	0.09

a: Expected number of tags when all of them come from the Pribilofs.
b: Number of tags recovered.
c: Rate of intermixture.

One may note than an appreciable fraction of young males on the Commander are of the Pribilof origin, while the immigration from the Pribilofs to Robben Island is of slight extent. Since extensive tagging operation on the Soviet breeding islands began from 1958, a reliable number of tags would be expected from the three year old class in the commercial kill from the 1961 season. It is not possible yet to calculate the intermixing rate between the Robben and the Commander origins. For the 1959 season, however, 19 of the Robben Island tags which had been applied in 1957 were collected from the three year old seals killed on Robben Island, but no Robben Island tag was found on the Commander Islands.

This may suggest that the immigration from Robben Island to the Commander Islands would be of less extent.

5. CHANGE IN THE GROWTH RATE OF THE PRIBILOF SEAL

It is a general belief that the size of an animal in nature is more or less controlled by the density of the population. Schefter (1955) discussed the relationship between body size and population density in several species of mammals such as the fur-seal, brown rat and vole. In his paper, he pointed out that the size of the Pribilof fur-seal has been decreased in accordance with the increase in abundance. In any element such as body-length, weight, and basilar length and zygomatic width of skull, seals in the 1910's were significantly larger than 1940's when the population reached a plateau. He presumes that the shortage of food around the Pribilofs in summer is, perhaps, the best explanation of the retarded growth rate of the seal. He assumes further the following reaction as one possible explanation of the present condition of the fur-seal herd: high density—more intensive competition—greater averaged distance travelled by a half-million nursing mothers in obtaining food—longer in-

Table 24. Comparison of length and weight among various samples.

Body-length

Sex	Between the 1952 and the 1960 samples off Japan Age class									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Male	−	+	−	−	−	−				
Female (Preg.+Non-preg.)	+	+	−	−	+	−	−	−	−	−

Sex	Between the 1952 and the 1959 samples off U.S.A. Age class									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Male	−	+	+	+						
Female (Non-preg.)	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−
〃 (Preg.+Non-preg.)	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+

Sex	Between the Japanese and the U.S.A. samples in 1959 Age class									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Male	−	+	+	+						
Female (Preg.+Non-preg.)	−	+	+	+	+	+	+	+	−	+

Body-weight

Sex	Between the 1952 and the 1959 samples off U.S.A. Age class									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Male	−	+	+	+						
Female (Non-preg.)	−	+	+	+	+	−	+	+	−	−

−: Non-significant in 95 per cent confidential limit.
+: Significant in 95 per cent confidential limit.

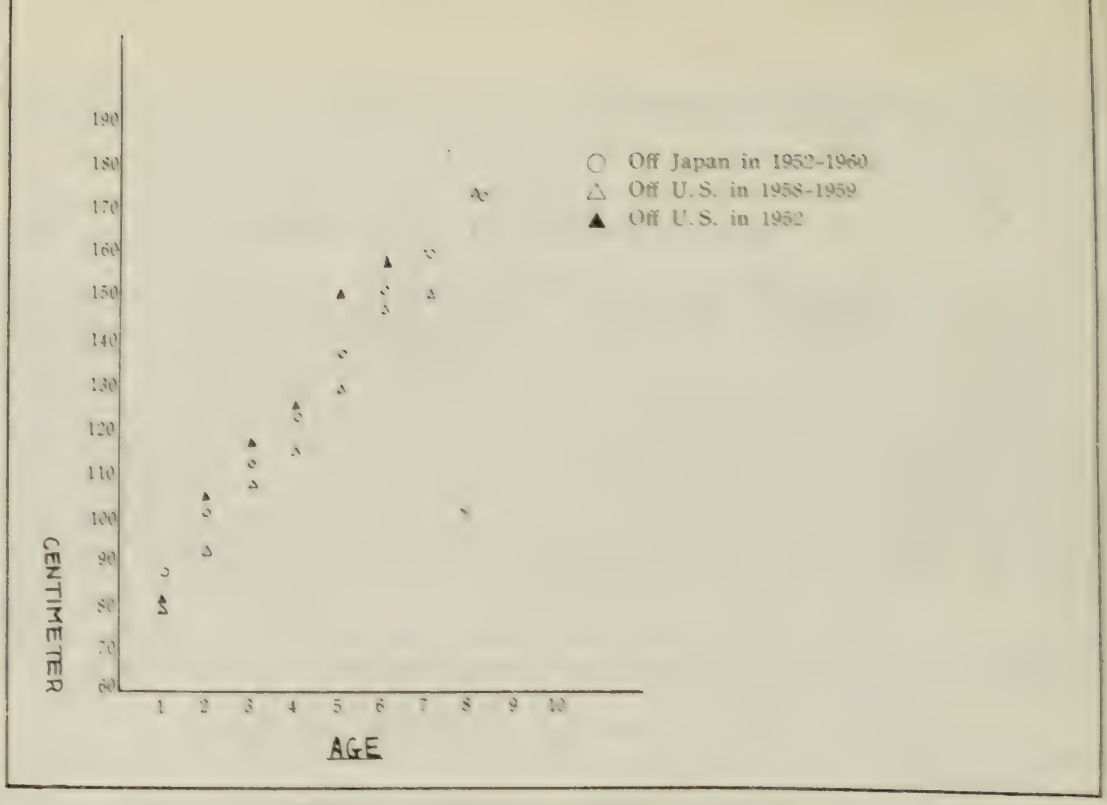


Figure 4. Comparison in body-length of males

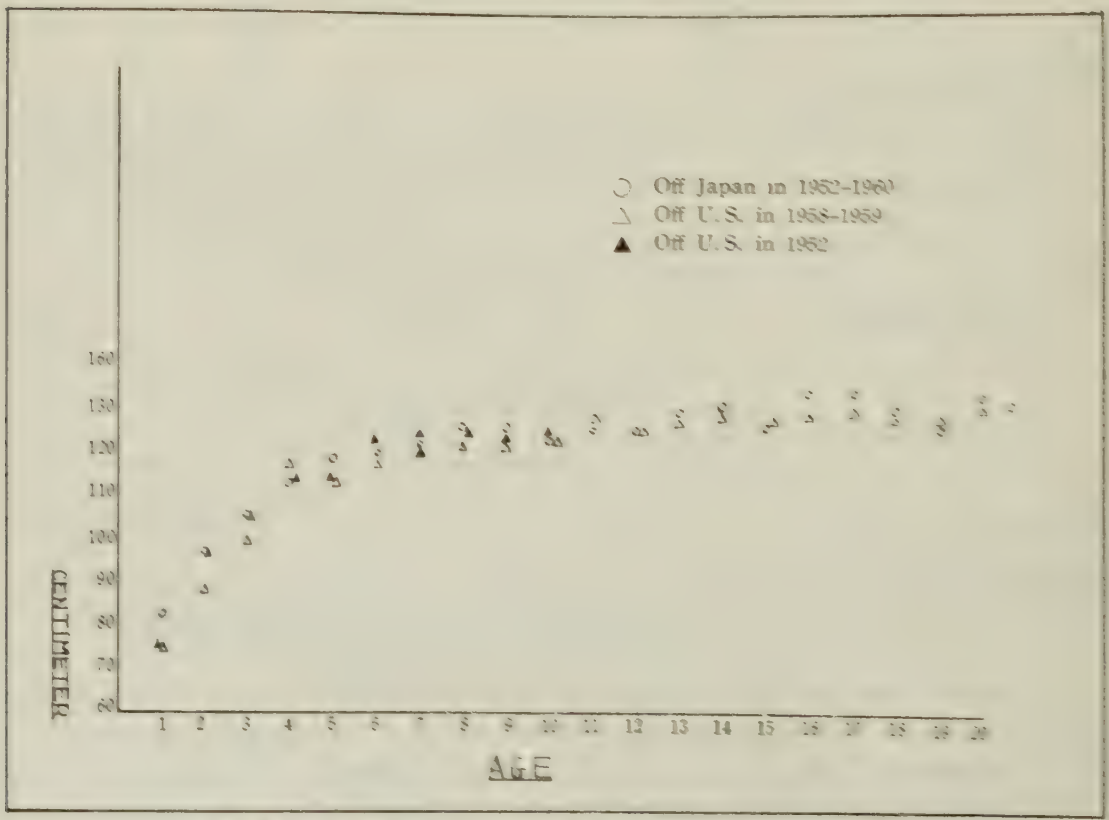


Figure 5. Comparison in body-length of non-pregnant females.

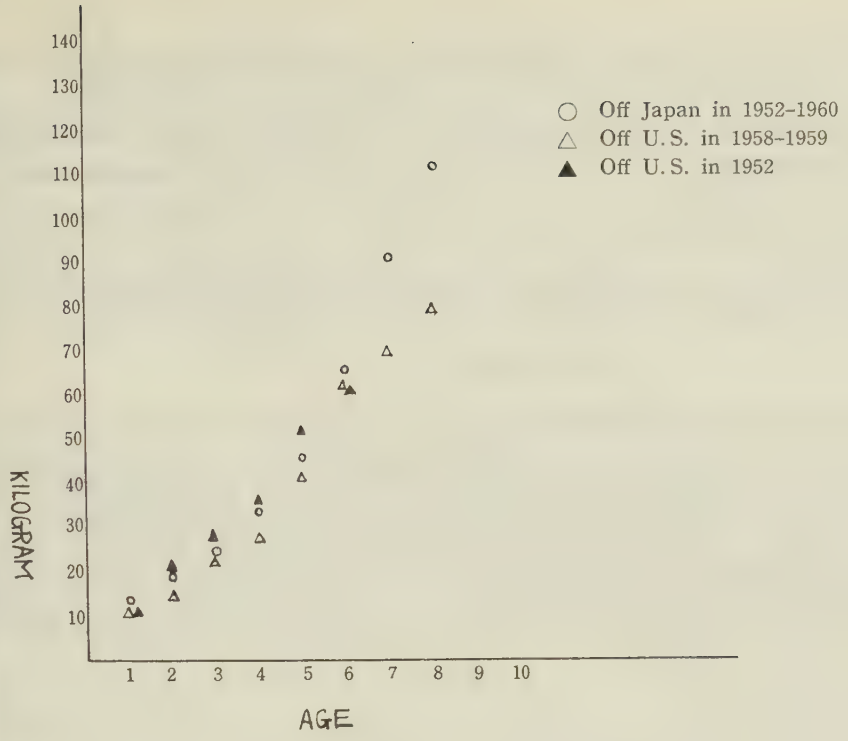


Figure 6. Comparison in body-weight of males.

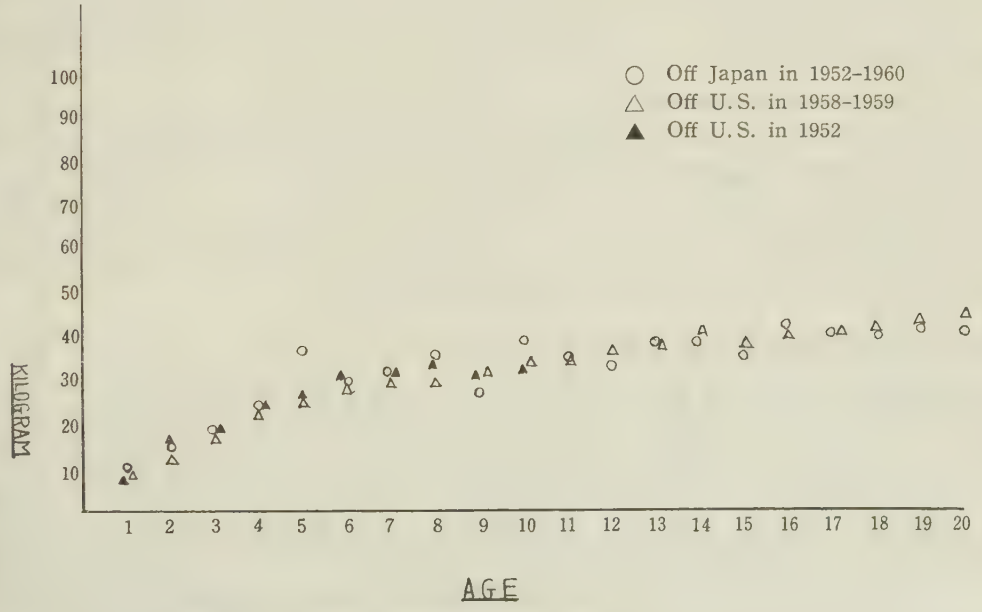


Figure 7. Comparison in body-weight of non-pregnant females.

tervals between nursing -less average weight gained by pups higher pup mortality on land in the first summer and higher pup mortality at sea during the first critical winter.

The present Author made a series of comparisons of body-length among various samples collected at sea. Comparisons in mean value of body-length and weight, by age class, are shown in Figure 4–7. Body-length was measured in a straight line from tip of nose to tip of the diminutive tail. Since the body-weight of the pregnant and the non-pregnant females are not comparable because of extra weight of the fetus, female group is divided into the pregnant and the non-pregnant sub-groups. The result of comparison by means of t-test are given in Table 24.

Comparison among samples taken off Japan

Applying t-test to the difference in body-length between the 1959 and the 1960 samples taken pelagically off Japan, no significant difference is observed at each age class in either case of male or of female. The 1952 sample is not included in the test because of lack of the detailed records. Considering, however, the mean value of body-length at each age class, it seems that no noticeable difference would be observed among samples taken off Japan in these years.

Comparison among samples taken off America

The 1958 and the 1959 samples taken off America are quite identical both in body-length and in weight. Therefore, the 1959 sample is compared with the 1952 one. In the case of male, t values obtained are fairly high at age 2 to 4 either in body-length or in weight. But there is little difference in the yearling class. In the case of female, t value at each age class is also fairly high except those at the yearling and 5 years old classes. Therefore, it may be concluded that seals collected in 1952 are comparatively larger in size than those in 1959 except the yearling group. Figures also show that the difference seems to be greater in younger classes, age 2 to 5, than in older classes. Seeing, as is discussed in the later section, that the mortality rate up to age 3 has been getting higher in these years probably because of higher density of pups produced and yields from the 1953 year class and onwards have been decreasing, it is quite acceptable that the decrement in growth rate may be attributed to the higher density effect in younger stage. However, it is incomprehensive that no significant difference is observed in the yearling class despite that the higher density effect might work upon the yearling group most strongly.

Comparison between Japanese and American samples

Between samples taken off Japan and America in 1959, a significant difference is observed at age 2 to 4 in male and 2 to 6 in female. No difference is again observed in the yearling class. Since no significant difference was recognized among American and Japanese samples taken in 1952, the difference in the recent years may be produced by poor growth of the Pribilof seals since 1953. As is stated elsewhere, some fraction of seals wintering off Japan are of the Pribilof origin, so that the original difference, then, between the Soviet breeding islands and the Pribilof origins must be more significant than actually observed in these comparisons. The intermingling ratio is greater in male than in female in young seals.

This coincides with the result that t values obtained in male are rather lower than those in female, particularly in young classes. It is quite incomprehensive, however, that the difference in growth in the yearling group is not significant between these two samples. The most critical stage, when seals may be subjected to grave mortality, must be sometime in the first year of life.

6. THE PREGNANCY AND THE MORTALITY RATE OF FUR-SEALS

A. Pregnancy rate

The most important property of the stock in the study of the fur-seal population dynamic is the age-schedule of the population in nature and the pregnancy rate of female by age class. Indentification of pregnancy in individual female is easily made either on land or on sea. Pregnancy can be identified by the newly formed corpora luteum in the ovarium collected in the earlier part of the pelagic life. In the later part of the pelagic life, a pregnant female has a fetus unless it is resorbed or aborted. In the breeding season on land, that is just after delivery, the pregnancy in the last season can be identified by the form of uterus horn and the remainning corpora. There are a number of samples available on which the apparent pregnancy rate by age is calculated. These rates are compared with each other in this section in order to learn the real pregnancy rate. Samples used for the comparison are:

As a pelagic sample;

Samples collected off Japan in 1950, 52, 58, 59 and 60.

Samples off North America in 1950, 52, 58 and 59.

As a land sample;

Samples taken from the commercial kill on St. Paul and St. George in 1956, 57 and 58.

Table 25. Pregnancy rate of pelagic sample.

Age	OFF JAPAN														
	1950[1]			1952[2]			1958[3]			1959[4]			1960[5]		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
3	—	—	—	—	—	—	512	8	2	357	3	1	160	1	1
4	37	20	54	251	86	34	260	129	50	278	164	55	159	82	52
5	34	27	79	177	141	80	212	181	85	161	138	86	153	123	80
6	24	23	96	96	84	81	111	88	79	107	94	88	97	84	87
7	25	23	92	74	61	82	58	52	90	60	54	90	62	58	94
8	26	24	92	54	49	91	35	31	89	42	38	91	33	31	94
9	10	10	100	48	41	85	30	28	93	23	22	96	20	17	85
10	11	8	73	61	55	90	17	15	88	20	16	80	9	9	100
10_+	24	20	83	100	84	84	21	17	79	135	88	65	41	37	90
Total	191	155	81	861	601	70	1,256	549	44	1,183	617	52	734	442	60

A: Number of female B: Number of pregnant C: Percent pregnant

1) From Wilke (1951).
2) From Taylor et al (1955).
3) From Tokai Regional Fisheries Research Laboratory (1959-a).
4) From Tokai Regional Fisheries Research Laboratory (1959-b).
5) From Nagasaki et al (1960).

Age	ALASKA SITKA 1950[1]			ALASKA SITKA 1951[2]			1952[3]			OFF NORTH AMERICA 1958 (U.S.A.)[4]			1958 (CANADA)[5]			1959 (U.S.A.)[6]		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	39	1	3	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	1	1	100	80	1	1	42	1	2	31	3	10	93	6	6
5	1	0	0	4	4	100	28	12	43	70	32	46	25	13	52	114	64	56
6	2	2	100	8	6	75	49	40	82	99	80	81	24	16	70	118	91	77
7	2	2	100	9	8	89	39	28	72	103	92	89	25	18	72	143	109	76
8	3	3	100	10	8	80	55	42	77	102	91	89	16	14	78	164	142	87
9	4	4	100	7	6	86	35	31	89	81	78	96	16	12	75	108	96	89
10	6	3	50	15	13	87	31	23	74	97	85	88	7	6	86	96	82	85
10+	23	17	74	53	36	68	187	140	75	653	519	77	72	56	78	555	468	84
Total	41	31	76	107	82	77	504	317	63	1,286	979	76	216	138	64	1,391	1,058	76

1) and 2): From Nagasaki (1953).
3): From Taylor et al (1955).
4): From Wilke et al (1958).
5): From Pike et al (1958).
6): From Niggol et al (1959).

Table 26. Pregnancy rate of female seals.

Age	Bachelor drive[1] 1956 (St. Paul)			Harem drive[1] 1956 (St. George)			Harem drive[2] 1957 (St. Paul)			Bachelor drive[2] 1957 (St. George)			Bachelor drive[3] 1958 (St. Paul)			Bachelor drive[3] 1958 (St. George)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
3	173	0	0	14	0	0	127	1	1	39	0	0	1,487	7	<1	391	1	<1
4	619	61	10	120	14	12	632	84	13	251	12	5	1,154	69	6	484	41	9
5	540	306	57	122	64	52	1,543	825	53	421	153	36	529	250	48	334	143	43
6	409	302	74	86	70	81	982	770	78	322	185	58	460	297	65	252	153	61
7	265	201	76	60	50	83	700	569	81	176	112	64	121	87	72	162	90	56
8	207	127	61	60	43	72	576	431	75	136	85	62	57	37	65	71	46	65
9	116	73	63	40	26	64	483	354	74	111	63	75	38	26	68	52	32	60
10	66	34	51	29	20	69	257	189	74	76	35	46	63	38	61	39	25	64
10+	616	218	36	208	110	52	1,303	664	51	477	241	51	40	14	35	163	74	32
Total	3,012	1,322	44	739	397	54	6,603	3,887	60	2,011	886	44	4,011	825	21	1,922	705	32

1) From Abegglen et al (1956).
2) From Abegglen et al (1957).
3) From Abegglen et al (1958).

Table 27. Combined pregnancy rate.

Age	Bachelor drive, Prib.		Harem drive, Prib.		Pelagic, America		Pelagic, Japan	
	Number of samples	Percent preg.	Number of samples	Percent preg.	Number of samples	Percent preg.	Number of samples	Percent preg.
3							954	1.1
4	2,458	7.4	752	13.0	153	7.8	880	47.5
5	1,824	46.7	1,665	53.4	123	46.3	610	83.3
6	1,443	64.9	1,068	78.7	172	79.1	349	85.3
7	724	67.7	760	81.4	167	82.0	217	87.5
8	471	62.6	636	74.5	173	85.0	157	90.4
9	318	61.0	523	72.7	132	91.7	111	90.9
10	244	54.1	286	73.1	135	83.7	109	86.2
10+	1,296	42.2	1,511	41.2	914	76.6	280	74.6

The observed pregnancy rates by age class of these samples are tabulated in Tables 25 and 26. In the Pribilof samples on St. George in 1956 and on St. Paul in 1957 were taken from the groups hauled out on harem grounds, while these on St. Paul in 1956, on St. George in 1957 and on both islands in 1958 were obtained from the bachelor ground drives. Applying χ^2-test for a comparison between two samples both from harem drives, χ^2 values from 4 to 10 year old classes are unexceptionally small. On the other hand, χ^2 values among four samples from bachelor ground drives are rather high in each age class. Since bachelor ground drives were started from the end of July when harems were about to be broken down and many females were beginning to appear on bachelor grounds, the degree of intermixture between females from harem ground and others in the female kill might change not only with the date of the killing but also by the methods of driving. Hence, the values may not be stable, changing from sample to sample. Overall pregnancy rates, combining these samples into four groups, the pelagic off Japan and North America, the land on bachelor ground and harem ground, are given in Table 27.

Comparison among samples on the Pribilof

As is shown on the Table 26, the pregnancy rate on harem grounds is unexceptionally higher than that on bachelor ground. Almost all of the pregnant females are supposed to land on a harem ground, or rookery, because they never deliver pups on some place other than a rookery. As fur-seals have post-parturitional estrus, likewise other species of Pinnipeds,

Table 28. Change in the observed pregnancy rate by round in term of percentage
(From Abegglen *et al*, 1957)

Date of kill	St. Paul (Harem drive)	St. George (Bachelor haul)
27 June — 1 July	>99.0	
2 July — 6 〃	98.0	
7 〃 —11 〃	97.0	
12 〃 —16 〃	96.0	
17 〃 —21 〃	89.4	
22 〃 —26 〃	72.2	44.4
27 〃 —31 〃	54.9	54.3
1 Aug. — 5 Aug.	54.7	61.4
6 〃 —10 〃	41.0	67.5
11 〃 —15 〃	49.9	48.0
16 〃 —20 〃	47.6	53.6

and they copulate four to seven days after delivery (Bartholomew, 1953), the observed pregnancy rate must be higher in the female group on a rookery at the height of the mating season, that is until the end of July, when the pregnant females land there successively. The pregnancy rates of the combined age classes by round, in term of percentage, both of harem drives and bachelor ground drives are given in Table 28.

The table shows that the pregnancy rate in the group driven from harem is extremely high in the period from the end of June until the beginning of July. Afterwards, however, it gradually declines until sometime in August when no difference from that among seals from bachelor grounds can be found because of complete mixture between these two groups.

The observed pregnancy rate at this time of the season may possibly be underestimated. According to Bartholomew's observation (1953), females, after copulating, feed at sea for about ten days. There is a possibility, therefore, the initial group with higher pregnancy rate is hardly involved in the subsequent catches. These observations may suggest that the pregnancy rates so far observed may be biased in the samples taken either on bachelor ground or harem ground. It is noticed that the rates in the land samples are considerably lower than those in the pelagic samples.

Comparison between the North American and the Japanese pelagic sample

The pregnancy rates observed in the pelagic samples are considerably higher as compared to those in the land sample. Although a significant segregative distribution is recognized in the pelagic life of fur-seals, no positive evidence has been demonstrated for segregative distribution between the pregnant and the non-pregnant females. As far as the pregnancy rate is concerned, therefore, the rate obtained from the pelagic sample may be considered to be most appropriate.

It is noticed that the rates in the North American samples are unexceptionally lower than those of the Japanese ones (see Figure 8). The difference is larger in younger age of less than 8 year old classes. In the Japanese samples, the average rate is 46 per cent in 4 year old and 83 in 5 year old, while in the American samples it is only 8 per cent in 4 year old and 46 in 5 year old class. This significant difference in the observed pregnancy rates

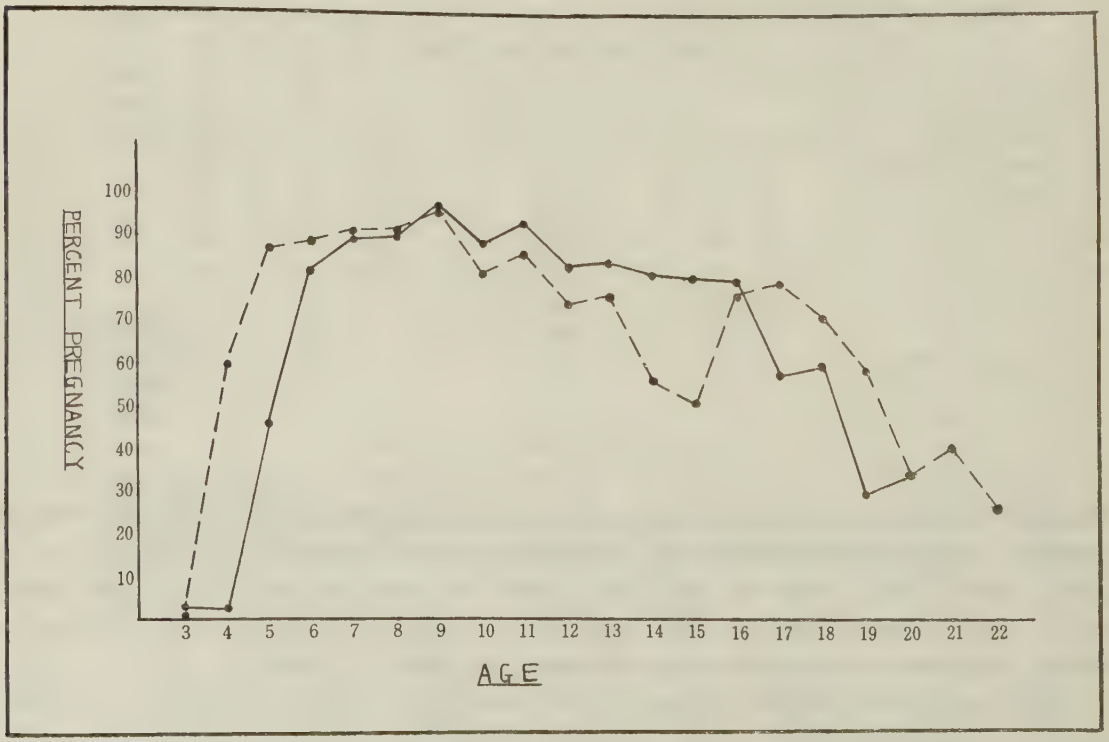


Figure 8. Comparison in pregnancy rates between Japanese and American pelagic samples.

The American is represented by solid line and the Japanese by broken line.

was already pointed out in the joint report. As the seal group migrating off Japan comprises both the Pribilof and the Soviet breeding islands origin, the pregnancy rate in the group off Japan should be more or less higher than that in the Pribilof group, if the Soviet breeding islands group has higher pregnancy rate than that in the Pribilof group.

The significant difference in the observed pregnancy rates between the Japanese and the American samples may not be caused by the different growth rate of these two groups. The study of genital tract reveals that about ninety per cent of 2 year old females is still immature but only 10 per cent is immature in 3 year old female seals (Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, 1959-a). The majority of 3 year old females have some follicles in their overium. Judging from the fact that the difference is larger in younger age classes, the cause of the difference may possibly be understood as follows. Table 28 shows the number of kill by round and by age made on St. Paul Island in 1957. In the earlier part of the season, from June until mid-July, the 6-year-old class dominates in the catch and the females younger than that are rather scarce. From mid-July until August, however, the 5-year-old class takes dominance and then 4 year class has the highest frequency in September. In other words, it is suggested that older female land earlier. Meanwhile, the breeding activity is at its height in June-July but declines greatly in August. Then the majority of younger females except those which land early may not have a chance to join a harem. Although the detailed information on the Commander and Robben Island have not been yet reported, it may be imagined that a larger part of younger females may land there early as compared to the Pribilofs.

Change of pregnancy rate by age

The pregnancy rates by age observed in the Japanese samples in 1959 and the North American samples in 1958 are shown on the Figure 8. Although a difference is observed in the rates between two groups, as mentioned above, the same trend is recognized in these two groups, that the rate increases up to 9-year-old and then gradually falls down until about 18-years old. After that it goes down rather sharply. As the pelagic sample size available to this study is not large, particularly in age classes older that 10, these observed values must more or less affected by the sampling error. The general pattern of the change in the pregnancy rates by age, however, would be demonstrated by these pelagic samples.

Yearly change in the pregnancy rate

Comparing the observed pregnancy rates of the American pelagic sample in 1952 with those in 1958, it is shown that the rates in 1958 are generally higher than those in 1952. Applying χ^2-test, significant difference is recognized only in 4 and 7 year old groups. Considering, however, the rapid increase in the estimated pups-production on the Pribilofs since 1953, it can be presumed that the pregnancy rates in 1952 was lower than those in the subsequent years. Particularly, the big difference in 4 year old group should be noticed.

B. Mortality rate

Although the study of mortality is vitally important for fur-seal biology, no condiseration has ever been given on this aspect because the commercial kill on the breeding islands

han been limited to bachelor groups. Females have been subjected to the commercial kill on the Pribilofs since 1956. In 1956 and 1957 killing seasons, females amounting to 25 and 47 thousands were killed regardless of their size, but a size limit has been set up even in the female kill since 1958. Therefore the age-composition of kill available for consideration of mortality are only those obtained in 1956 and 1957. As was mentioned elsewhere, the kills on St. Paul in 1956 and on St. George in 1957 were made from the groups hauled out on bachelor grounds, while those on St. Paul in 1957 and St. George in 1956 were made on harem grounds.

Age-compositions of those catches are given on Table 10-16 of Section 4, together with those obtained pelagically in various waters in the North Pacific. As was already pointed out, the segregative distribution by age and sex is clearly noticed in the pelagic life of fur-seals, and the pelagic catch off Japan involves seals both Pribilof and Soviet breeding islands origins. These complexties in distribution on sea make the evaluation of the age-composition of catch very controversial. Also, it may possibly be assumed that the year-to-year change in recruitment, as measured by the catch of group three male seals, is considerably large in these years.

Under the conditions mentioned above, it is almost impossible, in the present stage of study, to calculate accurate mortality rate by age based on the observed age-composition of catches.

In order to have a broad idea about mortality, however, the apparent decreasing coefficients by age and by sample are calculated and tabulated in the following table (Table 29). Also the apparent mortality rate for a period of years are given in the table.

Table 29. Calculated decreasing coefficient from female groups killed.

Age	America	St. Paul	St. George	St. Paul	St. George	Off Japan	
	1958	1957	1957	1956	1956	1958	1952
3- 4						0.677	0.138
4- 5				0.564		0.202	0.364
5- 6		0.681	0.246	0.590	0.323	0.652	0.603
6- 7		0.394	0.454	0.407	0.294	0.614	0.249
7- 8		0.106	0.214	0.154	0.194	0.511	0.329
8- 9		0.101	0.251	0.875		0.182	0.092
9-10		0.626	0.306	0.302	0.221	0.511	
10-11							
11-12							
12-13	0.198						
13-14	0.177						
14-15	0.260						
15-16	0.238						
16-17	0.469						
17-18	0.465						
18-19	0.451						
19-20	1.540						
Mean		0.327	0.340	0.469	0.183	0.478	0.269

Glancing over the plotted points on Figure 9, it is suggested that the mortality rate in young age classes is higher but declines until age 7 to 10 years old and gradually increases

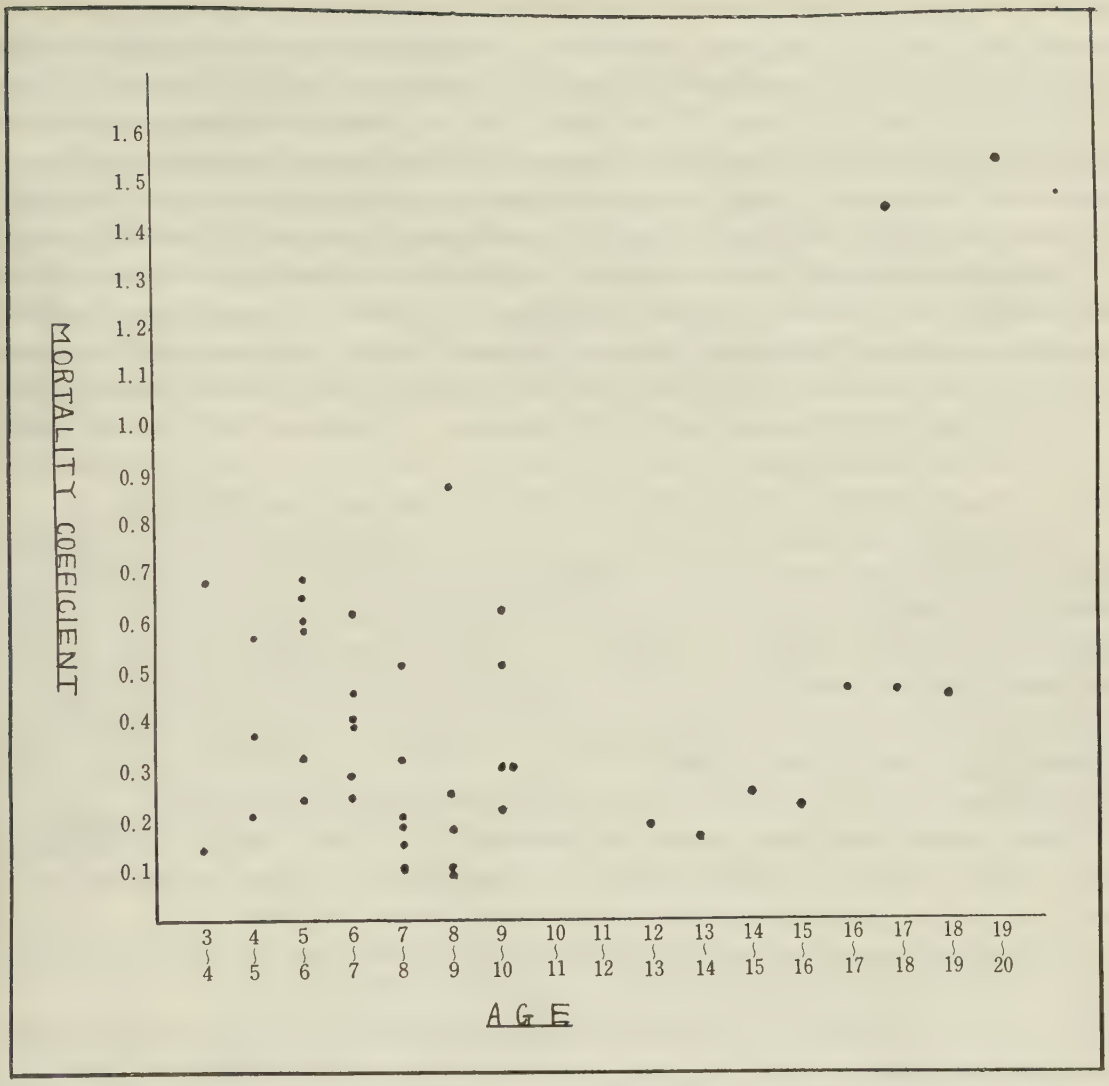


Figure 9. Mortality coefficient calculated from various pelagic samples.

in older classes. This trend would be more realistic than assuming a constant rate throughout the life-span. As is shown in Table 4 of Section 2, howevere, the annual natural mortality rate could not be over 9 per cent to expect 8–10 per cent annual increase in pup-production which was actually observed on the Pribilofs in earlier years. Almost all of the calculated values are far higher than 9 per cent. At the present stage of study, therefore, no dependable estimation for the mortality rate is yet obtained.

7. PUP MORTALITY ON LAND

The newly born black pup spends several months during the pupping season on the breeding island. It has been reported that the mortality of black pups during this period on the Pribilofs is very high in these years. The number of dead pups counted on the Pribilofs is listed in Table 30. As the table shows, the rate of dead pups to the total

number of pups born was low, amounting only to 2-3 per cent, in earlier years, while it is considerably high, 10-15 per cent, in the 1950's. Although the cause of the high mortality in these years is not fully analysed yet, Doyle (1957) examined 1,729 dead carcasses of pups on the Pribilofs and found that 971 individuals died by hookworm infection and 633 by emaciation. Other kinds of injuries were recognized as the cause of death but their occurrence is of lesser extent. Death by emaciation occurs at a rather constant rate throughout the season but that by hookworm infection is heavily observed from 10 July to 15 August.

On Robben Island, it is reported that the mortality rate amounted to 15.5 per cent in 1959 which is quite comparable to that observed on the Pribilofs in these years. According to the examination of 299 dead individuals, 70 per cent of them died because of traumatic injuries including abscessed hematomata from head injuries. These injuries are caused mostly by the ferocious fighting among bulls on the rookeries. 10.6 per cent died from starvation.

On the Commander Islands, on the other hand, the mortality rate is low, amounting to only 2 per cent on Medny and 6 on Bering with 4 per cent as the combined value.

The high mortality rate, amounting to 15 per cent, is observed both on the Pribilof and Robben Island but the causes of death detected are quite different. The noticeable difference is that the death by hookworm is dominant on the Pribilofs while no hookworm infection is observed on Robben Island. The reason for this significant difference in spite of the intermixture of seals among breeding islands, presumably originates from the life history of this parasite. Olson (1952, 53) studied the life history of this species on the Pribilofs. Summary of his work is given below:

1. Hookworm larvae survive over the winter in great numbers on the rookery.
2. Sandy beaches where large numbers of hookworm larvae were present the preceeding fall were free of them the following spring, due presumably to frequent inundation by the sea.
3. The first larvae were recovered in the spring from below about four feet of snow and ice.
4. The hookworm population disappeared by the early part of July from rookeries thickly populated with seals.
5. Disappearance of the larvae is due probably to (a) aging, (b) drying of the rookery, and (c) being taken up by the seals. Larvae entering pups developed adult worms, whereas those entering adult seals are destroyed.
6. Hookworm larvae reappeared by late August and early September as the result of hatching of the eggs deposited on the rookeries during the summer.
7. Hookworm larvae survive up to 10 or 11 months on rookeries where seals were not present the past summer.
8. Hookworm larvae move vertically in the soil but probably not horizontally of their own activities.
9. Pups of each generation are infected by hookworm larvae hatching from eggs deposited by pups of the proceeding year because the eggs do not hatch until late in summer.
10. Experimental evidence to date suggests that hookworm larvae may not become infective under natural conditions before exposure to a winter on the rookeries.
11. High mortality among heavily infected pups occurs during exposure to cold rains.

12. Of pups dying from uncinariasis, 90 per cent of them were infected with 134 to 1,547 adult hookworms, mean 461±327 S.D.

13. On the basis of these observations, approximately 90 per cent of the pup mortality may be due to uncinariasis.

14. While hookworm eggs are deposited in great numbers on the rookeries beginning about July 1, they do not begin hatching until the early part of September.

Olson's study shows that the infection rate of pups by hookworm, apart from its variation by some climatic conditions, might be proportional to the number of pups died by hookworm last season. Denoting the number of pups born in t th. year as P_t and the total number of dead pups as D_t, and assuming that all of dead pups are by hookworm, the following equation might be proposed:

$$D_{t-1} \cdot \alpha = \frac{D_t}{P_t}$$

where α is a constant.

Using figures given in Table 30 and plotting D_t/P_t against D_{t-1}, the relationship between these two values seems to be curvilinear rather than straight. If a straight line is fitted, D_t/P_t is negative when D_{t-1} is zero. In other words, the mortality rate actually observed in lower density, in general, is less than that expected from the above mentioned assumption.

At the present stage of the study, therefore, it may be presumably better to consider simply that hookworm is the obligate predator of pup and to apply the Ricker's equation to the relationship between the number of pups born and that of dead one, which was established from the prey-predator relationship.

Table 30. Number of pups born and dead pups counted in selected years on the Pribilofs[1].

(Data from 1914 up to 1922 are from Kenyon et al (1954), and dead pup counts after 1950 are from Abegglen (1956, 57)).

Year	Number of dead pups	Number of pups born	Percent dead pups
1914	1,743	93,250	1.9
1915	1,811	103,527	1.7
1916	2,482	116,977	2.1
1917	3,850	128,024	3.0
1918	4,302	142,915	3.0
1919	4,834	157,172	3.1
1920	4,219	167,527	2.5
1921	4,397	176,655	2.5
1922	3,223	185,914	1.7
1950	54,520	—	—
1951	74,196	503,196	14.7
1952	—	—	—
1953	83,173	650,173	12.8
1954	100,978	681,978	14.8
1955	75,544	698,544	10.8
1956	103,642	861,642	12.0

[1] Figures after 1951 are of St. Paul Island only.

$$F=P_0\cdot\alpha\cdot e^{-kP_0} \tag{1}$$

where F is the number of surviving pups, P_0 is the total number of pups born, and α and k are parameters.

Dividing both sides of the equation by P_0 and taking log of it,

$$\log\frac{F}{P_0}=\log\alpha-k\cdot P_0 \tag{2}$$

Basing on figures given in Table 30, the following equation is obtained:

$$\log\frac{F}{P_0}=-0.000000203\cdot P_0+0.0005 \tag{3}$$

This straight line may be considered to pass the origin, because $\log\alpha$ is negligibly small. Equation (3) is written as:

$$F\fallingdotseq P_{0e}-0.000000203\cdot P_0$$

or

$$F\fallingdotseq P_{0e}-0.000203\cdot P_0 \tag{4}$$

when unit is taken as a thousand individuals.

According to this equation, the maximum number of F is observed when P_0 amounts to 4,926,000 individuals. The number of dead pups actually observed are scattered widely

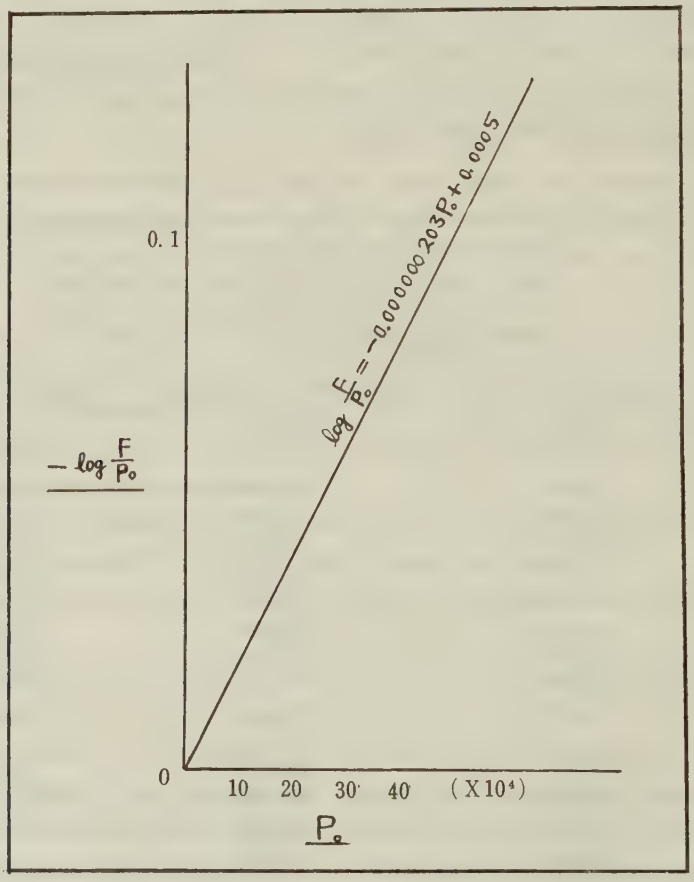


Figure 10. Relationship between $\log F/P_0$ and P_0.

around calculated values from the equation. These wide deviation may be largely originated from some climatic condition during the pupping season, as is pointed out by Olson (1953) and Abegglen et al (1959). Abegglen et al mentioned "High mean temperatures may accelerate development of the hookworm larvae and thereby cause peak abundance of the larvae from, in its infectious stage, to exist before many pups are born. Colder mean temperatures, however, may be delayed enough to coincide with the time when most seal pups are available."

The infection rate or the mortality rate in the pup stage is apparently affected by the climatic condition such as temperature and participation on the breeding island. However, the primary factor of the mortality would be the density effect which may have some quantitative relation to the magniture of hookworm population, because the only possible explanation for the lower level in mortality rate, around 2–3 per cent in 1914–22, but the higher mortality, amounting to 15 per cent in recent years, is the change in mortality by density. The physical condition may be regarded as the secondary factor.

8. RELATIONSHIP BETWEEN PUP-PRODUCTION AND ANNUAL YIELD

As is already described in Section 3, the number of pups born on the Pribilofs as estimated from tag-recovery results has been sharply increasing since 1953. If the mortality rate from the pup stage up to the bachelor stage remained constant throughout a period of years up to the present, the number of bachelors killed in recent years should have been increasing. In reality, however, the number of bachelors killed has been conversely decreasing since the 1956 season. The estimated numbers of pups on St. Paul Island at the time of tagging[1] since 1947, are listed in Table 31, together with the number of kills from the corresponding year class at age 3 and 4. Figure 11 shows that the catch decreases with the increases of pup-production.

Several assumptions may be proposed for this reverse correlation. First, high mortality has been produced by some unfavourable weather condition during the pelagic life of young

Table 31. Values of fall pup population and the catch at age 3 and 4.

Year	P'^1	$F'_3{}^1$	$F'_4{}^1$	$F'_3{}^1$	$F'_4{}^1$	F'_3/P'	$\log(F'_3/P') + 9.210^2$
1947	400	31.746	19.658	31.746	19.658	0.07937	6.677
1948	394	30.014	15.699	30.014	15.699	0.07618	6.636
1949	421	27.995	12.502	27.995	12.502	0.06650	6.500
1950	—	40.506	15.365	40.506	15.365	—	—
1951	429	32.350	18.083	32.350	18.083	0.07541	6.625
1952	412	30.733	31.448	30.733	28.560	0.07460	6.615
1953	567	38.290	8.855	26.590	7.547	0.04690	6.151
1954	581	23.473	5.599	16.804	5.556	0.02892	5.667
1955	623	27.863	10.555	27.216	10.446	0.04369	6.080
1956	758	10.671	—	10.203	—	0.01346	4.902

[1]; Unit of these figures is a thousand individual.
[2]; Neperian log of ten thousands.

1) Tagging was carried out for several days in the beginning of September when heavy mortality of pups on land was almost over.

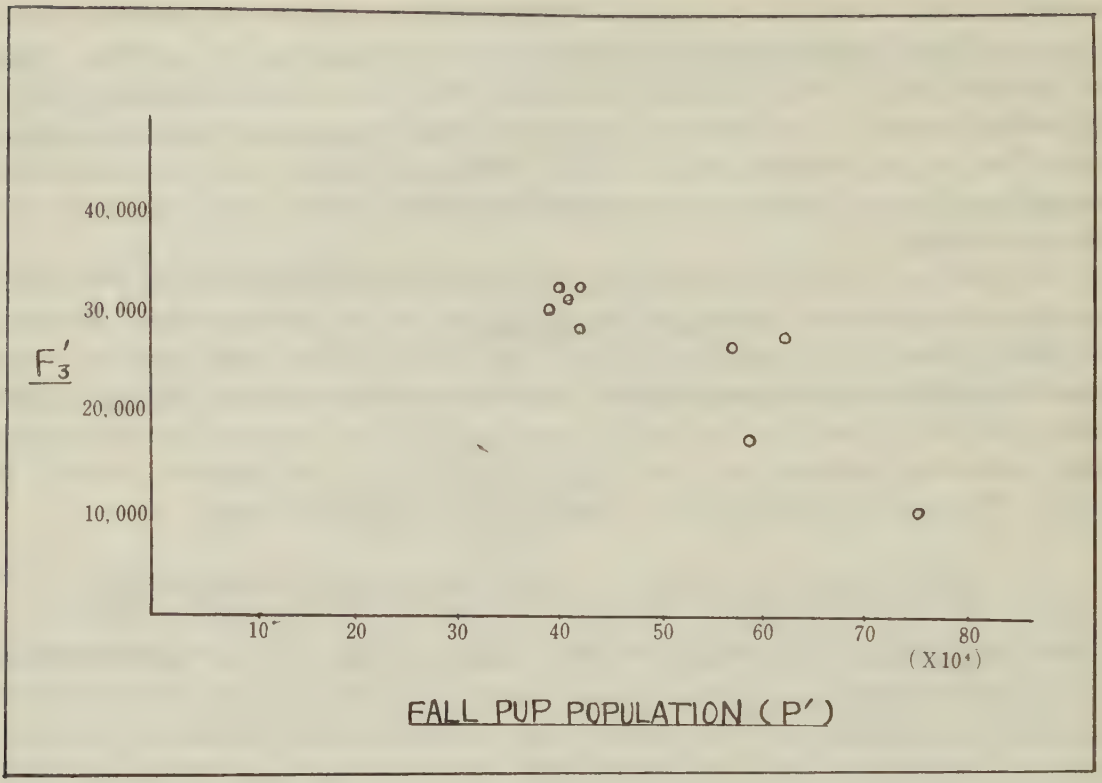


Figure 11. Relationship between fall pup population and the resulting catch at age 3.

seals. If this assumption is appropriate although no evedence on the change of climatic condition in these years is revealed, the same kind of variation in the catch must be observed sometime in the earlier years. Such a long term fluctuation may possibly be detected, as is explained later. However, the primary change in yields up-to-date should be produced by the density-effect. Second, some change may occur in the availability of the bachelor group. In other words, the majority of younger seals remain at sea during the sealing season without landing on the breeding island. Since, however, the proportion of the Pribilof seals to the total group wintering off Japan has also dropped in the 1956 and 1957 year classes (see Section 4), it is quite reasonable to presume that seals of these year classes were subjected to higher mortality sometime in their younger stage. Third, that density-dependent mortality worked upon the younger seals, from pup stage to age 3. Considering that, as is revealed in other section, younger seals taken off American continent were smaller in 1958 and 1959, both in body-length and in body-weight, compared to those collected in 1952, the third asumption would be most probable. However, an ecological study on the pelagic life of younger seals has not been made so that we have no knowledge what is the mechanism of the density-dependent mortality and when it has its effect. Pups, after pupping season, begin a pelagic life when they feed on fish and squid. The short period of this drastic change in feeding might be most critical stage when they are subjected to serious mortality. Younger seals, particularly the yearling class, have a different habitat from that of adults during their pelagic life (see Section 4). They do not move far south as adult females do.

They may form fairly dense groups somewhere in northern waters. As a result, there is a possibility that the density-dependent mortality works upon the yearling group during the early part of their pelagic life.

The reproduction curve on the basis of the density-dependent mortality shoule be made up only on the biological mechanism of it. Since we have no knowledge about that aspect, however, several reproduction curves are applied to the present case.

The most simple relationship between the parental stock size (P) and the resultant recruitment to reproductive group (F) is parabolic, namely

$$F/P=aP+b$$

where a and b are constant.

Chapman (1959) applied this relationship between the estimated number of the fall pup population[1] and the relative number of return at four year old and calculated that the level of maximum return is expected when the fall pup population amounts to about 380,000 individuals.

There are two types of reproduction curve available which are constructed on a theoretical basis. The first is by Ricker (1954), namely

$$F=aP\cdot e^{-bP}$$

where a and b are constant.

The second is by Beverton and Holt (1957), that is

$$F=1/(\alpha+\beta/P)$$

where α and β are constant.

In the later equation, the value of F converges to $1/\alpha$ when P is infinite, so that the F value never decreases by the increases in P value. Therefore, this equation is not applicable to the case of fur-seal reproduction. Ricker's equation, calculated on the numerical relationship between prey and predator species, may be applicable, because F has maximum value on a certain level of P.

Ricker's equation is written as:

$$\log\frac{F}{P}=aP+b \qquad (5)$$

Applying this equation to data of P' (fall pup population) and $F'3$[2] values given in the table, the following equation is obtained:

$$\log\frac{F'3}{P'}=-0.0044P'-0.76 \qquad (6)$$

where the unit of P' and $F'3$ is a thousand individuals.

Correlation coefficient is calculated as 0.947. If the equation (6) is valid to the relation-

1) Fall pup population is the abundance of pups alive at the time of tagging carried out in the beginning of September, so that it excludes the number of pups dead before the time of tagging operation.

2) $F''3$, and $F''4$ are the total catch at age 3 and 4, respectively, and these figures since 1953 include the kills made in August. $F'3$ and $F'4$ exclude the August kill so that they are quite comparable to the kills before 1953 when the sealing was terminated at the end of July.

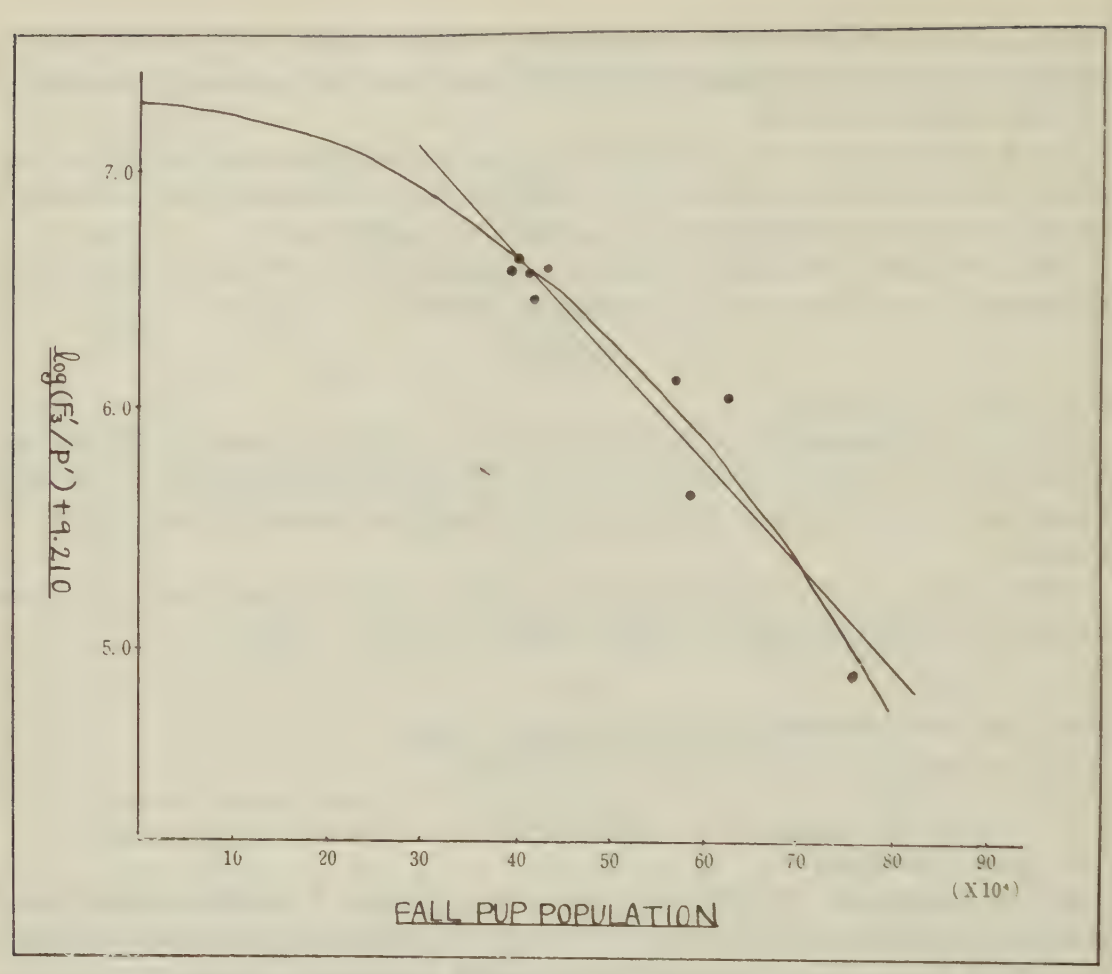


Figure 12. Relationship between fall pup population and log $F'3/P'$.

ship between the fall pup population and the resultant catch after three years, the value of $F'3/P'$ when P' is zero, amounting to 0.466, must be the expected value when free from the density-dependent mortality. Assuming that the sex-ratio at birth is equivalent and the mortality rate up to age 3 both in male and female is identical, 0.466×2, or 0.93, divided by the rate of catch at age 3 is the survial rate up to age 3 when the density dependent mortality is not operating. Since the total ratio between the catch at age 3 and that at age 4 from the 1947 to the 1955 year classes is approximately 2 to 1, the rate of catch at age 3 can not be over 66 per cent. If it is 66 per cent, the survival rate up to age 3 when P' is zero far exceeds unity.

Hence, the relationship between $\log F'3/P'$ and P' should be represented by a convex curve instead of a straight line. Apart from biological foundation, various types of curves are applicable for this purpose. One of the most simple curves in which d/dp' $(\log F'3/P')$ is zero when P' is zero and the relationship between $\log F'3/P'$ and d/dp' $(\log F'3/P')$ is represented by a simple curve, is of the generalized form of Ricker's equation, namely

$$\log \frac{F'3}{P'} = aP'n + b \qquad (7)$$

Table 32. Calculated values from equation (5) and (7).

	By equation (5)			By equation (7)		
P'	log $F'/P'+2.210$	F'_3/P'	F'_3	log F'_3/P'	F'_3/P'	F'_3
0	8.447	0.4658	0	7.297	0.1475	0
10	8.007	0.3001	30.01	7.257	0.1417	14.17
20	7.567	0.1937	38.74	7.138	0.1258	25.16
30	7.127	0.1245	37.35	6.939	0.1031	30.93
50	6.248	0.0517	25.85	6.303	0.05462	27.31
60	5.808	0.0333	19.98	5.868	0.0352	21.15
70	5.368	0.0214	15.02	5.348	0.0210	14.71
80	4.928	0.0138	11.05	4.751	0.0116	9.26

(Unit of P' and F'_3 values is a thousand individuals).

where $a<0$ and $n>1$.

Putting 2 to n, the following equation is obtained;

$$\log F'3/P' = -0.0000039776 \cdot P'2 - 1{,}913 \qquad (8)$$

where the unit of P' and $F'3$ is a thousand.

The calculated of log $F'3/P'$, $F'3/P'$ and $F'3$ for selected values of P', from the equation are given in Table 32.

Correlation coefficient is calculated as 0.958 which is slightly higher than that obtained when the straight line is fitted. The survival rate up to age 3 when it is free from the density-dependent mortality, calculated in the same way as given above, amount to more than 0.45.

Since we hardly know the biological mechanism of the density-dependent mortality, we can not make up a satisfactory curve to which data fit well. The selection of the curve, therefore, is by finding the one fitting best the observed data in question. Unfortunately, there is no way to check the validity of the equation (8). At the present stage of the study, the Author considers that it is very useful to apply the equation (8) for further consideration. Progress of fur-seal biology in the future would modify the equation to more realistic one. For instance, as is mentioned in Section 3, there is a great possibility that the number of pups after 1953 is somehow overestimated, or that the estimated pup number during 1947–1952 are underestimated, because the sharp increases in pup-production since 1953 can not be expected from a possible life-table of the fur-seal herd. If possible, the right part of the reproduction curve should have a more steep slope in either case. A more refined reproduction curve can be established when the question in the recent pup-production is clarified. In any case when one of these curve described above is applied, the maximum return at age 3 is expected when the fall pup population amounts to about 400,000 individuals.

Now, from equation (4) and (8), the relative magnitude of surviving seals at age 3 ($F'3$) against the total number of pups born (P_0) is represented by the following equation:

$$F'3 = \alpha \cdot P_0 e^{-0.000203 \cdot P_0 - 0.0000039776 \cdot P_0^2 e^{-0.000406 \cdot P_0}} - 1.913 \qquad (9)$$

This relationship between pup-production (P_0) and the expected catch at age 3 ($F'3$) is plotted in Figure 13.

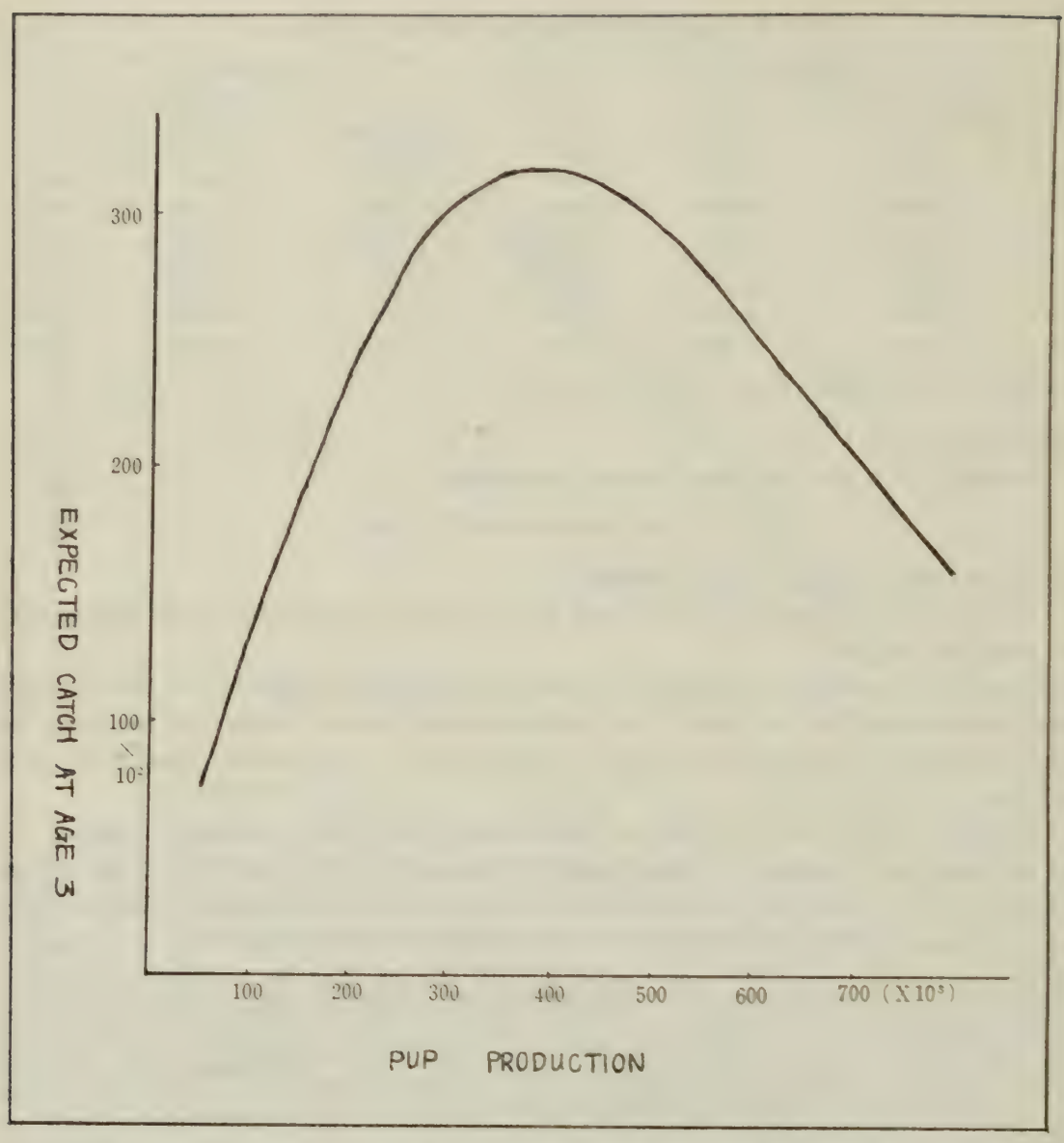


Figure 13. Relationship between pup production and expected catch at age 3.

9. RECONSTRUCTION OF THE REPRODUCTIVE SCHEME

In the last section, it is learned that the magnitude of survivors at the end of age 3, in terms of a relative value, is estimated from equation (9). Then, one may make up a reproduction schedule for appropriate values of both the mortality rate and the pregnancy rate by age.

Prior to seting up the scheme the annual pup-production in earlier years should be estimated. Fortunately we have qute dependable numbers of pups being born on St. Paul Island which were made by direct counting during the period from 1912 until 1924. Available

values after that period, however, are only those estimated from the tag-recovery results for recent years which are given in Section 3. No estimate had been made in the intermediate period. Since tag-recovery results for recent years lead to an incomprehensively sharp increase in pup-production on the Pribilofs since 1953, some unknown technical error must be involved in these estimates. It may be pointed out, however, that the number of pups produced has more or less increased. Considering that the returns at age 3 and 4 have dropped in these years so that the recruit to reproductive group would be diminished, recent pup-production would be almost at a maximum level.

Plotting the numbers of pups produced in selected years on a graph, it is suggested that the increase of pup-production since 1912 may be very likely logistic. In order to calculate a logistic curve, the maximum amount of pup production is considered to be 720,000, mean of estimated pups produced from 1953 to 1956. Fitting counted numbers, then, for earlier years, from 1912 to 1924, to a sigmoidal curve, the following equation is obtained:

$$P_0=\frac{720{,}000}{1+e^{-0.096t+2{,}308}} \qquad (10)$$

where the unit of t is a year and the origin of time t is 1912.

Although there is no possible way to determine how actual numbers, for the intermediate period, fit this curve, deviation from it must not be great. According to Table 4 in Section 2, the innate capacity of increase of the above equation, 0.096, is quite acceptable and may be very close to the reality. Calculated pup-production by year from equation (10) are listed in Table 33, together with counted numbers in the period from 1912 to 1924.

Table 33. Calculated and counted pup production on St. Paul.

Year	Calculated	Counted[1)]	Year	Calculated	Counted[1)]
1912	70,609	70,000	1927	227,560	
13	77,519	79,500	28	242,751	
14	84,329	79,300	29	258,435	
15	91,580	88,100	30	274,495	
16	99,709	98,900	31	291,027	
17	108,238	108,700	32	307,824	
18	117,594	122,600	33	324,763	
19	127,096	133,900	34	342,043	
20	137,905	143,300	35	360,000	
21	148,454	149,900	36	376,569	
22	160,142	158,900	41	460,358	
23	172,373	—	46	533,729	
24	185,280	172,500	51	592,105	
25	198,785		56	634,921	
26	212,202				

1) From Kenyon *et al* (1954).

Reliable mortality rate by age class has not yet been calculated, as is discussed in Section 6, because the coefficient of decrease calculated from the observed age-composition of various samples varies very widely, and is much higher than the real one. For the sake of simplifying calculations, the natural mortality rate is considered to be constant throughout reproductive ages. Judging from Table 4, annual mortality rate can not be more than

10 per cent for a year to expect about 10 per cent increase in pup-production. Therefore, 5 and 10 per cent are applied as annual mortality rate. The pregnancy rates applied herein are also more or less smoothed as follows to make calculation easy (See Section 6).

Age	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pregnancy rate	0.08	0.46	0.80	0.90	0.90	0.96	0.90	0.90	0.80
Age	13	14	15	16	17	18	19	20	
Pregnancy rate	0.80	0.80	0.80	0.80	0.60	0.60	0.30	0.30	

Table 34. Reproduction table of the Pribilof fur-seal herd from 1932 up to 1935 in term of relative magnitude in the case of 5 per cent mortality rate.

Year	Age	a	b	c	d	e	f	c′	d′	e′	f′
1931	1	291,027	29,900								
30	2	274,495	29,150								
29	3	258,435	28,400								
28	4	242,751	27,450	26,078	26,980	27,693	28,405	2,086	2,158	2,215	2,272
27	5	227,560	26,400	23,826	24,774	25,631	26,308	10,960	11,396	11,790	12,106
26	6	212,202	25,300	21,692	22,635	23,535	24,349	17,353	18,108	18,828	19,479
25	7	198,785	24,250	19,752	20,607	21,503	22,358	17,777	18,546	19,353	20,122
24	8	185,280	23,050	17,836	18,756	19,577	20,428	16,052	16,889	17,619	18,385
23	9	172,373	21,800	16,025	16,944	17,827	18,598	15,384	16,266	17,114	17,854
22	10	160,142	20,700	14,455	15,224	16,097	16,986	13,010	13,702	14,487	15,287
21	11	148,454	19,500	12,936	13,732	14,463	15,292	11,642	12,359	13,017	13,763
20	12	137,905	18,250	11,501	12,289	13,045	13,740	9,200	9,831	10,436	10,992
19	13	127,096	17,250	10,328	10,926	11,657	12,393	8,262	8,741	9,340	9,914
18	14	117,596	15,900	9,044	9,812	10,380	11,091	7,235	7,850	8,304	8,873
17	15	108,238	14,850	8,025	8,592	9,321	9,861	6,420	6,874	7,457	7,895
16	16	99,709	13,800	7,085	7,624	8,162	8,855	5,668	6,099	6,530	7,084
15	17	91,580	12,700	6,194	6,731	7,243	7,754	3,716	4,039	4,346	4,652
14	18	84,329	11,800	5,467	5,884	6,394	6,881	3,280	3,530	3,836	4,129
13	19	77,519	10,900	4,798	5,194	5,590	6,074	1,439	1,558	1,677	1,822
12	20	70,609	9,950	4,161	4,558	4,934	5,311	1,248	1,367	1,480	1,593
			Relative number of pups produced					150,732	159,313	167,829	176,222
			Actual number of pups produced					307,824	325,349	342,740	359,880
			Resultant relative recruit at age 3					30,500	30,950	31,350	31,560

a: Calculated pup-production by year.
b: Resulting recruit as age 3 after three years in term of relative magnitude (Read from the reproduction curve)
c: Relative age-composition of female seal group in 1932
d: 〃 in 1933
e: 〃 in 1934
f: 〃 in 1935
c′: Relative magnitude of pup-production by age class in 1932
d′: 〃 in 1933
e′: 〃 in 1934
f′: 〃 in 1935

Calculation of the reproductive schedule of the herd from the 1932 up to the 1935 season is given in Tables 34 and 35.

On the column *a* of Table 34 is given the calculated number of annual pup-production from 1912 to 1931. The resultant recruitment after three years, corresponding to the number

of pups born in a given year, which is read from the reproduction curve (See Figure 13) is tabulated on the column *b*. Giving a mortality rate, that is 5 per cent in the present case, the primary age-schedule of the female group in relative magnitude in 1932 can be calculated. This is listed in the column *c*. Column *d* is given the relative number of pups born, calculated from the survivors at each age class and the pregnancy rate of the corresponding age. The sum of these figures, amounting to, say, 150,732 in 1932, that is the total number of pups born then, must be more or less underestimated, because figures on the columns *b* and *c* are in relative term and equivalent to real number only when the exploitation rate is a hundred per cent. According to the sigmoidal curve, on the other hand, 307,824 pups

Table 35. Reproduction table of the Priblof fur-seal herd from 1932 up to 1935 in term of relative magnitude in the case of 10 per cent mortality rate

Year	Age	a	b	c	d	e	f	c′	d′	e′	f′
1931	1	291,027	29,900								
30	2	274,495	29,150								
29	3	258,435	28,400								
28	4	242,751	27,450	24,705	25,560	26,235	26,910	1,976	2,045	2,099	2,153
27	5	227,560	26,400	21,384	22,235	23,004	23,612	9,836	10,228	10,598	10,862
26	6	212,202	25,300	18,444	19,246	20,012	20,704	14,755	15,397	16,010	16,563
25	7	198,785	24,250	15,910	16,600	17,321	18,011	14,319	14,940	15,589	16,210
24	8	185,280	23,050	13,611	14,319	14,940	15,589	12,250	12,887	13,446	14,030
23	9	172,373	21,800	11,587	12,250	12,887	13,446	11,148	11,760	12,372	12,908
22	10	160,142	20,700	9,901	10,428	11,025	11,598	8,911	9,385	9,923	10,438
21	11	148,454	19,500	8,395	8,911	9,385	9,923	7,556	8,020	8,447	8,931
20	12	137,905	18,250	7,072	7,556	8,020	8,447	5,658	6,045	6,416	6,758
19	13	127,095	17,250	6,015	6,365	6,800	7,218	4,812	5,092	5,400	5,774
18	14	117,594	15,900	4,989	5,414	5,729	6,120	3,991	4,331	4,583	5,496
17	15	108,238	14,850	4,194	4,490	4,873	5,156	3,355	3,592	3,898	4.125
16	16	99,709	13,800	3,508	3,775	4,041	4,386	2,806	3,020	3,233	3,509
15	17	91,580	12,700	2,906	3,157	3,398	3,647	1,744	1,894	2,039	2,188
14	18	84,329	11,800	2,430	2,615	2,841	3,058	1,458	1,569	1,705	1,835
13	19	77,519	10,900	2,020	2,187	2,354	2,557	606	656	706	767
12	20	70,609	9,950	1,660	1,818	1,968	2,119	498	545	590	639
				Relative number of pups produced				105,679	111,406	117,054	123,183
				Actual number of pups produced				307,824	324,503	340,954	358,807
				Resultant relative recruit at age 3				30,500	30,900	31,300	31,550

a: Calculated pup-production by year.
b: Resulting recruit as age 3 after three years in term of relative magnitude (Read from the reproduction curve)
c: Relative age-composition of female scal group in 1932
d: 〃 in 1933
e: 〃 in 1934
f: 〃 in 1935
c′: Relative magnitude of pup-production by age class in 1932
d′: 〃 in 1933
e′: 〃 in 1934
f′: 〃 in 1935

should be actually produced in 1932. Discrepancy between these two values may largely come from the premise that the exploitation rate equals to unity. A minor part of the discrepancy might be produced from some difference between a real pregnancy rate and the one applied to the calculation given above. Calculated number of pups produced from the

age schedule, then say, 150,732 should be corrected by the ratio 307,824/150,732 or 2.0422[1]. This ratio must be constant if all of the parameters applied such as the pregnancy rate of a given year class and the exploitation rate remained constant throughout a period of years. Hence, the actual number of pups born in 1933 must be 159,313×2.0422 or 325,349. This number of pups results in a relative recruitment 30,950 three year old females after three years. Repeating this procedure, the age-schedule and pups production together with its resultant recruitment at age three in each year since 1932 can be calculated. Those are tabulated in

Table 36. Calculated pup production and the expected catch at age 3 by year.

Year	5 per cent mortality		10 per cent mortality	
	Pup production	Catch at age 3	Pup production	Catch at age 3
1912	70,609	—	70,609	—
1913	77,519	—	77,519	—
1914	84,329	—	84,329	—
1915	91,580	9,950	91,580	9,950
1916	99,709	10,900	99,709	10,900
1917	108,238	11,800	108,238	11,800
1918	117,596	12,700	117,596	12.700
1919	127,096	13,800	127,096	13,800
1920	137,905	14,850	137,905	14,850
1921	148,454	15,900	148,454	15,900
1922	160,142	17,250	160,142	17,250
1923	172,373	18,250	172,373	18,250
1924	185,280	19,500	185,280	19,500
1925	198,785	20,700	198,785	20,700
1926	212,202	21,800	212,202	21,800
1927	227,560	23,050	227,560	23,050
1928	242,751	24,250	242,751	24,250
1929	258,435	25,300	258,435	25,300
1930	274,495	26,400	274,495	26,400
1931	291,027	27,450	291,027	27,450
1932	307,824	28,400	307,824	28,400
1933	325,349	29,150	324,503	29,150
1934	342,740	29,900	340,955	29,900
1935	359,880	30,500	358,807	30,500
1936	376,337	30,950	372,393	30,900
1937	392,133	31,350	386,916	31,300
1938	407,002	31,560	400,376	31,550
1939	420,893	31,600	412,712	31,600
1940	433,535	31,650	423,780	31,650
1941	444,824	31,600	433,457	31,700
1942	454,671	31,400	441,674	31,520
1943	464,958	31,230	448,557	31,360
1944	471,027	31,100	454,030	31,220
1945	476,368	30,850	457,933	31,120
1946	480,350	30,600	460,849	31,050
1947	482,660	30,400	462,349	30,850
1948	484,238	30,250	463,965	30,800
1949	484,391	30,100	464,423	30,700
1950	484,144	30,050	464,254	30,600
1951	483,256	30,000	463,732	30,600

1) This ratio indicates that the expoliation rate at age three would be roughly fifty per cent. This is quite acceptable since the ratio of kills at age 3 and 4 is roughly 2 to 1.

Table 34. Table 35 shows the same kind of figures when the mortality rate is assumed to be 10 per cent a year.

The number of pups produced and the resultant recruitment in term of relative value at age 3 in each year from 1912 to 1951, thus calculated, are tabulated in Table 36. The latter series of figures themselves are equivalent to annual yield from three year old bachelors. As Figure 15 shows, the change in these calculated yields is different from that in actual kills. Yield from age 3 bachelor males increases up to 1940 in the case of 95 per cent survival rate and 1941 in the case of 90 per cent and then decreases gradually in slight extent. It increases again from some year around 1953, and rather levels off at a certain level. Should the reproduction curve have a more steep slope on the right side part of it, as the actual case may be, the oscillation would be greater in vertical direction. Even if this is taken into account, the sharp decrease of the yields for these years can not be expected unless parameters such as pregnancy and mortality rates are changed by some causes. This

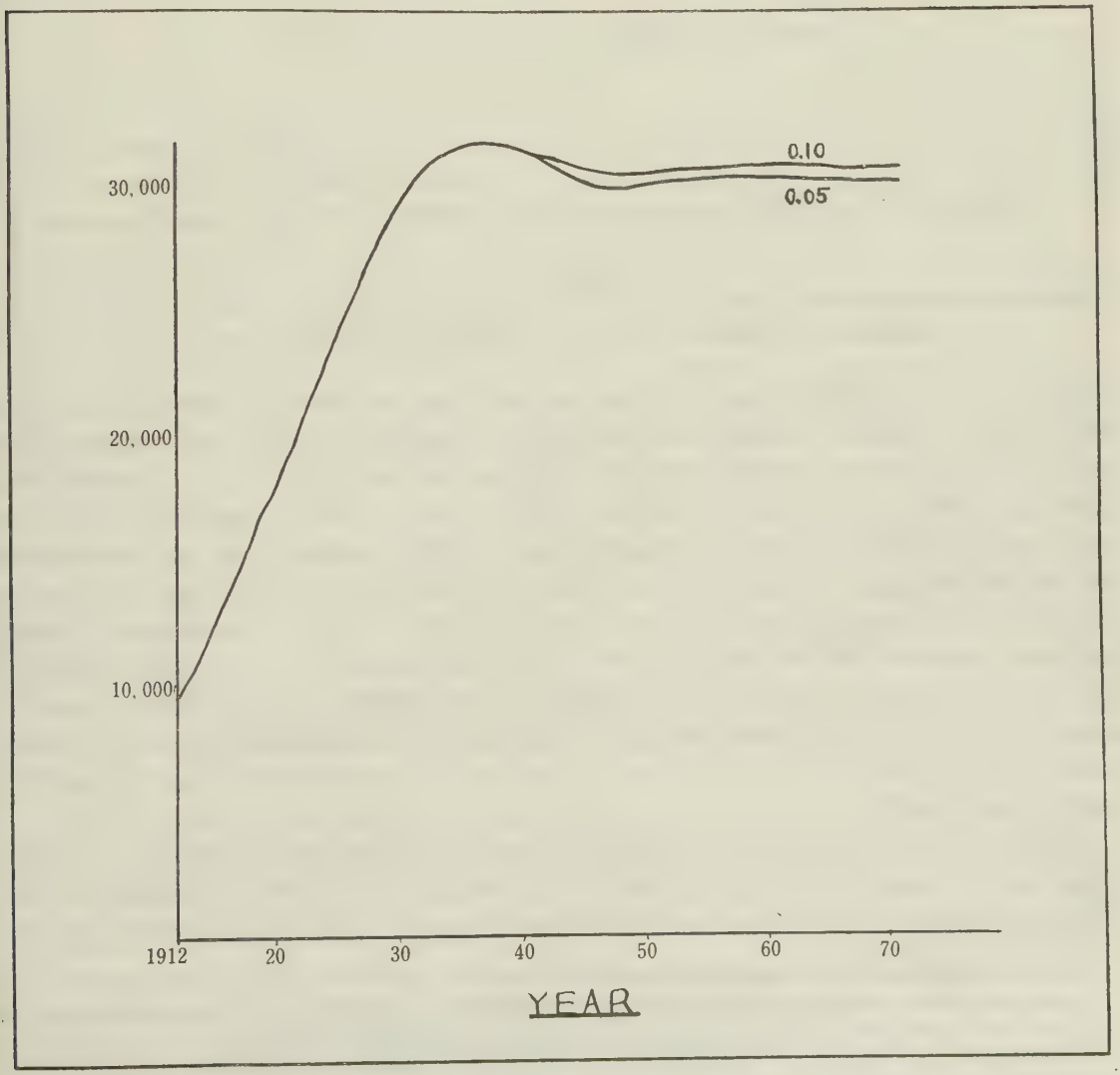


Figure 14. Change in yield at age 3 calculated from the model.

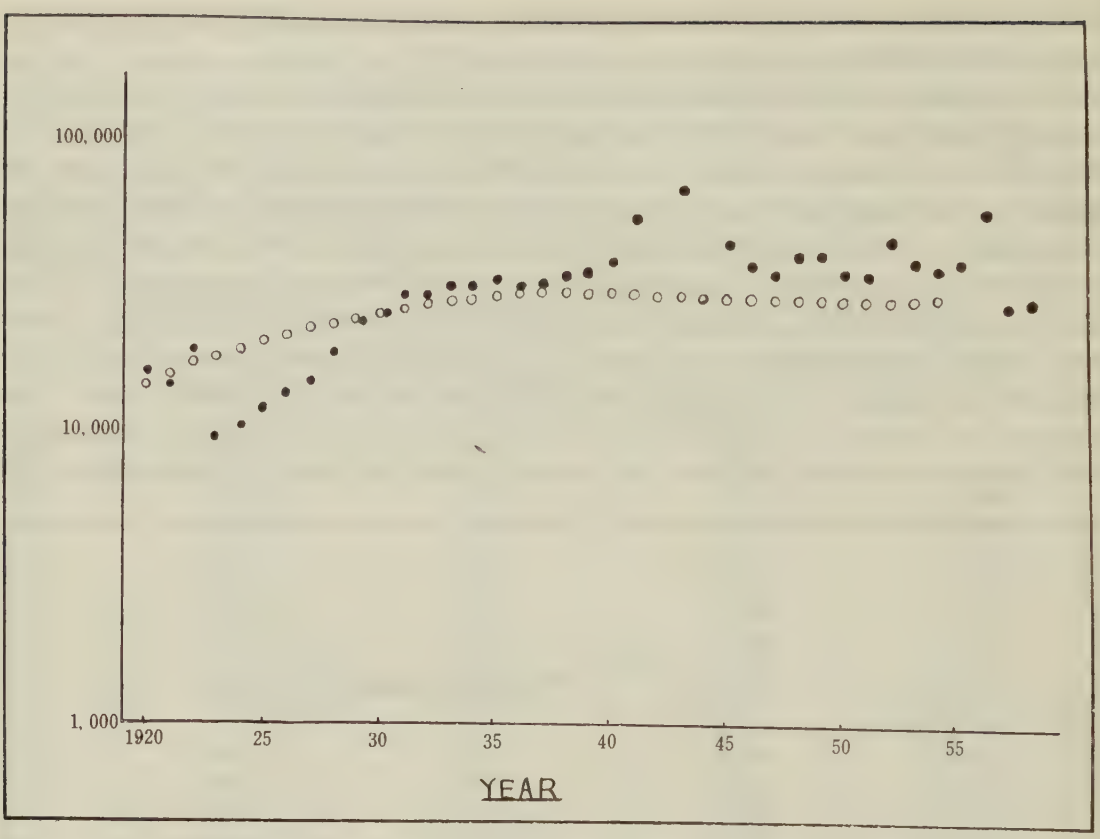


Figure 15. Comparison between expected and actual catch at age 3.

might be partly explained when the sharp increase in pup-production for these years is fully understood. Comparison of the actual yields at age 3 estimated[1] from the total male kills with the expected ones calculated from the model is given in Figure 15. It is noticed that these two series of values agree very well in 1920, 21 and 22, and in years after 1929. The lower yields from 1923 to 1928 may be caused by unknown factors such as unfavourable weather conditions in the winter time in the North Pacific which might result in heavier mortality of the younger seals. Scheffer (1950-b) reported that the young seals, mostly yearlings, encounters serious winter weather on sea and is subjected to grave mortality. Although the expected values from the model do not decrease to a significant extent, the actual yields have dropped rather sharply. This discrepancy is apparently due to the rapid increase in pup-procuction for these years which is quite incomprehensive unless parameters used are unchanged.

Tables 34 and 35 show that the exploitation rate to and including the three year old male group may be roughly 50 and 33 per cent in the case of 95 and 90 per cent annual survival rate, respectively. In the former case, therefore, the absolute number of the return as three

1) Age-composition of the annual kill before 1945 could not be calculated since the age-determination technique by means of tooth was not yet established. According to the age-composition of the catch from 1945 to 1952, the average proportion of three year old seals in the total male kill amounts to 62 per cent. Therefore, the only possible estimation of three year old seals in the catch before 1945 is obtained from the total male kill multiplied by 0.62.

year old males amounts to 60,000 individuals at the leveling-off-stage in recruitment. From the catch and their estimated age-composition on St. Paul Island from 1945 to 1952, it is estimated that about 32,000 three year old and 18,000 four year old seals, in an average, were killed there during that period. Hence, 9–10 thousands seals would remain as the escapement from killing at the end of the fourth year. Applying 95 per cent as the annual survival rate in subsequent age classes, the total number of bulls up to 20 year old amounts to nearly one hundred thousands individuals, The total number of bulls actually counted in these years has been only about twenty thousands. This implies that the mortality rate in male seals must be higher than that in females and probably amounts to 20–30 per cent for a year. In the later case, that is 90 per cent annual survival rate, the number of males returning at age 3 may be around 90,000 individuals and the escapement at the end the fourth year amounts approximately to forty thousands individuals. Therefore, the annual survival rate in female seals should not be as low as 90 per cent.

10. SUSTAINABLE YIELD FROM THE HERD

The current fur-seal protective treaty proposes in its preface that it is desired to take effective measures towards achieving the maximum sustainable productivity of the fur-seal resources of the North Pacific Ocean so that the fur-seal populations can be brought to and maintained at the levels which provide the greatest harvest year after year, with due regard to their relation to the productivity of other living marine resources of the area. As it is extremely difficult to study inter-specific relations in quantity among member species of a community, the following consideration is confined to the mono-specific basis without considering the predation by fur-seals upon other commercially important fishes. In the most cases of fisheries industries, the term "harvest" or "yield" is measured in a unit of weight but not individuals of fish caught. The weight of catch is generally proportional to the monetary income. In the case of the fur-seal industry, however, the harvest should be counted in the number of seal pelts obtained, because larger plets are not necessarily of higher price. Due to the selective kill of bachelor on the breeding islands which has been traditionally applied for the past fifty years, the marketed pelts or dressed-furs have been limited in quality and in price, so that no data of the change in commercial values either of different ages or sexes is now available.

There are two types of exploitation for catching seals. The first is to kill seals on the breeding island and the second is to hunt them on sea. The former is called the land-killing and the latter pelagic-killing.

The main difference between these two methods is that some kinds of selective kill is possible by the land killing but the pelagic killing is entirely non-selective for the group migrating in a hunting area. The traditional method which has been continued for many years either on the Pribilofs or on the Soviet breeding islands is the most typical selective kill.

When the exploitation of seals is considered, male and female groups should be treated separately because of the special reproduction behavior of this animal.

Needless to say, the most intelligent method in managing the fur-seal herd on St. Paul Island, if based on Table 36, is to keep the pup production in a season at the level of 390,000–

400,000 individuals which would result the highest return after three years, amounting to 124,000–128,000 three year old seals. If the pup number exceeds that level, the annual return decreases. It is apparent that the pup production in these years is too high to maintain the highest return.

Male kill

As is considered in the previous section, a greater fraction of seals die in the younger stage from birth until the end of the thrid year of life. In the 1937 year class, for instance, the number of male seals born was approximately 200,000 individuals but the resultant return after three years amounted only to 63,000[1] seals.

In other words, 68 per cent of them were lost for three years. Therefore, if the higher mortality works evenly throughout these three years, considerable amount of seals would be possibly killed and utilized during that period. Unfortunately, however, we have no information about how and when the higher mortality works upon the younger seals. If the high mortality coccurs for a short period just after the time when yearlings leave the island and the subsequent mortality for the second and third years is not so grave, the possible yield may not be greater than expected by the current method, because the pelts of pup seals have no commercial value. This question merits further study, particularly on the pelagic life of the younger seals.

If the kill to only bachelor group would be continued without any reduction of the cow population, the expected catch on St. Paul comprising three and four year old male seals would be stabilized with little fluctuation around 45,000 individuals unless drastic changes occurs in parameters such as the mortality and the pregnancy rates. Since, however, the recent sharp decrease in the yields were actually observed, same type of the drastic change may possibly occur in the future. The decrease in the yields for these years is apparently due to the rapid increase in pup production which resulted from an abnormal increase of the reproducting cow population. This would be explained by a higher[2] survival rate in younger seals in the later part of the 1940's.

It is stated in Section 2 that more extensive kill to bachelor group would be possible because of the higher idle index since 1953. It is now understood that the higher values recently observed are rather abnormal and can not be expected for a longer period of years. The normal rate of the idle index under the current exploitation method might be those observed in the 1940's.

If the annual pup production would be kept at the optimum level year after year, the expected yields would amount to 46,650[3] and 56,200[4] individuals which is the maximum sustainable harvest from the bachelor group on St. Paul and on all Pribilof Islands, respectively.

In brief, a sustainable yield to be expected by means of the traditional selective kill on

1) Expected catch at age three (31,600) divided by the exploitation rate (0.5).
2) Higher than that expected from the reproduction curve.
3) Catch at age three $(63,300 \times 0.5) +$Catch at age four $(31,650 \times 0.95 \times 0.50) = 46,650$.
4) 46,650 divided by 0.83, the ratio of the St. Paul catch to that of all Pribilofs.

the Pribilof Islands amounts to around 54,200[1]. Besides the regular commercial kill, some surplus of idle bulls can be removed at the present moment. although the number available is not over ten thousands.

If the annual pup production would be maintained at the optimum level by the reduction of the female population, the expected yields would amount to 56,200 individuals on the Pribilof Islands.

Female kill

The selective kill to the group three bachelors is very effective when the population size should be brought up to higher level than the present stage, because almost all of female seals can be reserved as the parental stock. When the population is at the ceiling level or in the oscillating stage, however, this type of exploitation is very wasteful because of the great loss of females. As is stated above, the optimum level of annual pup production on St. Paul Island is approximately 400,000 individuals which is equivalent to that in the 1937 season. This number of pups born results in about 63,000 three year old females after three years from their birth (see Table 36). Assuming that 63,300 three year old females are constantly recruited every year for a period of years, one may make up a reproduction scheme of female group for a given mortality, pregnancy, and exploitation rates. Putting the annual mortality rate as 0.05 which works constantly from age 3 up to age 20, and the pregnancy rate as values given in the previous section, the expected pup production, the total catch[2] from the female group and the number of females from age 3 up to 20 can be calculated for a given value of the annual exploitation[3] rate.

Exploitation rate	Pup production	Catch	Number of cows (From age 3 up to 20)
0.05	323,000	26,800	535,000
0.04	349,000	22,900	572,000
0.03	376,000	18,000	608,000
0.02	406,000	13,000	650,000

The result of calculation indicates that the annual exploitation rate must be 2 per cent in order to maintain the pup production at about 400,000 individual level which is produced from a female group amounting to 650,000 individuals. In other words, about 13,000 cows should be killed annually on St. Paul Island. Hence, 15,300 females can be harvested for a year on the Pribilofs. However, the present level of the female population may be much higher than the optimum. According to the estimate of the production on the Pribilofs in 1956, the number of pups born amounted to nearly a million individuals (see Table 9 of Section 3). The author believes that pup production since 1957 is gradually decreasing because of the smaller amount of recruits for these years. Although the estimated numbers of pups born since 1957 are not yet available, they must far exceed the optimum level. If the present production of pups is 700,000–800,000, on the Pribilofs, the number of female, from age

1) The St. Paul kill (45,000) divided by 0.83.
2) Catch is made non-selectively from the over-all female group from age 3 to 20.
3) It is assumed that sealing is carried out for a short period after the breeding season.

3 up to age 20, inclusive, should be around 900,000–1,100,000 individuals. Since the optimum number of female on the Pribilofs is about 800,000 (650,000/0.83), 100,000–300,000 female should be removed for attaining the most favourable level. Even if the surplus females are not removed by exploitation, the cow population may decrease gradually by self-regulation caused by the density effect.

Acknowledgements

This paper is largely based on the informations so far obtained by scientists of the U.S.A., Canada, U.S.S.R. and Japan under the North Pacific Fur Seal Commission. The author is indebted to the scientists concerned, particularly to Mr. F. Wilke, biologist in charge of Marine Mammal Research of U.S. Fish and Wildlife Service for his kind guidance throughout the work. Grateful acknowledgement is extended to Dr. Hiyama of Tokyo University, Dr. D.G. Chapman of University of Washington and to Dr. W. Ricker of Fisheries Research Board of Canada for their criticisms and advice. My thanks are also due to members of Marine Mammal Division of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory for their capable help and assistance.

References

Abegglen, C.E., A.Y. Roppel & F. Wilke, 1956: Alaska fur seal investigations, Pribilof Islands, Alaska. Manuscript report of field activities, June-September, 1956.

Abegglen, C.E., A.Y. Roppel & F. Wilke, 1957: Alaska fur seal investigation, Pribilof Islands, Alaska. Report of field activities, June-September, 1957.

Abegglen, C.E., A.Y. Roppel & F. Wilke, 1958: Alaska fur seal investigations, Pribilof Islands, Alaska. Report of field activities, June-September, 1958.

Abegglen, C.E., A.Y. Roppel & F. Wilke, 1959: Alaska fur seal investigations, Pribilof Islands, Alaska. Report of field activities, June-September, 1959.

Aikawa, H., 1942: Growth trend of the fur-seal herd on Robben Island. Suisan-Gakkai-ho, **9** (1).

Allen, G.M., 1942: Extinct and Vanishing Mammals of the Western Hemisphere. Amer. Comm. for Int. Wildlife, Wash. D.C.

Andrewartha, H.G. & L.C. Birch, 1954: The distribution and abundance of animals. Univ. of Chicago Press. Chicago.

Anonymous, 1959: Report on fur seal research carried out by the U.S.S.R. in 1959. Manuscript report.

Anonymous, 1958: Report on fur seal research carried out by the U.S.S.R. in 1959. Manuscript report.

Austin, L.O. & F. Wilke, 1950: Japanese Fur Sealing. Special Scientific Report, Wildlife, No. 6. U. S. Dept. of the Interior.

Bailey, N.J.J., 1951: On estimating the size of mobile populations from recapture data. Biometrika, 38.

Batholomew, G.A. Jr., 1953: Reproductive behavior of the Alaska fur seal, *Callorhinus ursinus*. Jour. Mamm., **34** (4).

Beverton, R.J.H. & S.J. Holt, 1957: On the dynamics of exploited fish populations. U.K. Min. Agr. and Fish., Fish. Invest., Ser., **2**, 19.

Bryant, C., 1869: On the habits of the northern fur seal (*Callorhinus ursinus*. Gray) with a description of the Pribilof group of islands. Bull. Mus. Compar. Zool., **2** (1).

Chapman, D. G., 1957: Estimate of escapement of fur seal bachelors from commercial harvest. Manuscript report.

Chapman, D.G., 1958: Population estimates of Pribilof fur seal pups based on 1957 data. Manuscript report.

Chapman, D.G., 1959: Population study of fur seals on St. Paul Island with special reference to female

killing program. Manuscript report.
Chapman, D.G., 1959: Preliminary report on forcasting the kill of male fur seal on the Pribilofs. Manuscript report.
Chapman, D.G. & C.O. Junge, 1954: The estimation of the size of a stratified population. Univ. Wash. Lab. of Stat. Res., Technical Rept., No. 16.
Chapman, D.G., 1952: Inverse, multiple and sequential sample censuses. Biometrics, 8.
Chiasson, R.B., 1957: The dentition of the Alaskan fur seal. Journal of Mammalogy, **38**, 3.
Christoffer, H.J., 1937: Computation of fur seals, Pribilof Islands. Alaska Fishery and Fur Seal Industries in 1936.
Doyle, L.P., 1957: Investigation of death losses in fur seal pups on St. Paul Island, June 28 to August 15, 1957. Manuscript report.
Elliott, H.W., 1882: A monograph of the seal islands of Alaska. Wash. Govt. Print. Off.
Hall, E.R., 1940: Pribilof fur seal on California coast. California Fish and Game, 26.
Hanna, G.D., 1921: Fur Seal census, Pribilof Islands, 1920. Alaska Fishery and Fur Seal Industries, 1920.
Ishino, K., 1935: Investigation of the Pribilof seals in the Western part of the Aleutian Chain.
Japanese Fisheries Agency, 1933: Migration of Pribilof fur seals into the waters off the coast of Japan.
Jordan, D.S. and others, 1898–99: The fur seals and fur seal islands of the North pacific ocean. U.S. Treasury Dept. Doc. 2017.
Kenyon, K.W., 1954: Alaska fur seal investigations, Pribilof Islands, summer of 1954. Manuscript report of field activities, summer of 1954.
Kenyon, K.W., V.B. Scheffer & D.C. Chapman, 1954: A population study of the Alaska fur-seal herd. U.S. Dept. Interior, Fish and Wildlife Serv., Spec. Sci. Rept. Wildl., 12.
Kitahara, T., 1951: Report of the fur-seal investigation on the Pribilof Islands.
Kuroda, N., 1940: Japanese Mammals.
Lucas, F.A., 1899: The Census of Mortality among Seals. Part of the Jordan Report (1898–99).
Nagasaki, F., 1953: Fur-seal. Fisheries Science Series, No. 8, Fisheries Agency, Japan.
Nagasaki, F., 1960: Some Aspects in the Distribution of Fur-Seals in the North Pacific. Bull. of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, No. 28.
Nagasaki, F., 1960: Abundance of pups on the Pribilofs estimated from tag-recoveries. Bull. of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, No. 28.
Nagasaki, F. & K. Matsumoto, 1957: Homing tendency of the bachelor seals to their native rookeries. Bull. Tokai regional Fish. Lab., No. 18.
Nagasaki, F., M. Tsuboi & K. Matsumoto, 1960: Report of Japanese fur seal research in 1960. Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Manuscript report.
Niggol K., C.H. Fiscus & F. Wilke, 1959: Pelagic fur seal investigations, California, Oregon and Washington. United States Department of Interior, Fish and Wildlife Service, unpublished report.
Olsen, O.W., 1958: Hookworms, *Uncinaria lucasi* Stiles, 1901, in fur seals, *Callorhinus ursinus* Linn. on the Pribilof Islands. Trams. 23rd N. Amer. Wild. Conf., Wildl. Mgmt. Inst., Wash. D.C.
Olsen, O.W., 1952: Report on first, second and third investigations of hookworm *Uncinaria lucasi* Stiles 1901, and hookworm disease of fur seals, *Callorhinus ursinus* Linn. on the Pribilof Islands, Alaska, summers of 1951, 1952 and 1953. U.S. Dept. Inter., Fish & Wild. Serv., unpub. reports.
Pearson, A.K. & R.K. Enders, 1951: Further observations on the reproduction of the Alaskan fur seal. Anatomical Record, **3**, No. 4.
Ricker, W.E., 1954: Stock and recruitment. J. Fish. Res. Bd. Canada, 11.
Ricker, W.E., 1958: Handbook of computations for biological statistics of fish populations. Fish. Res. Bd. Canada, Bull. 119.
Pike, G.C., D.J. Spalding & I.B. MacAskie, 1958: Preliminary report on Canadian pelagic fur seal research in 1959. Fisheries Research Board of Canada, unpublished report.
Pike, G.C., D.J. Spalding, I.B. MacAskie & F.P.J. Velsen, 1958: Preliminary report on Canadian pelagic fur seal research in 1958. Fisheries Research Board of Canada, unpublished report.
Scheffer, V.B., 1955: Body size with relation to population density in mammals. Jour. Mamm., 36.
Scheffer, V.B., 1950(a): Experiments in the marking of seals, and sea lions. U.S. Dept. Interior, Fish. and Wild. Serv. Spec. Sci. Rept. WL-4.
Scheffer, V.B., 1950(b): Winter injury to young fur seals on the Northerwest coast. Calif., Fish and Game, 36.
Scheffer, V.B., 1950: Growth of the tests and baculum in the fur seal. *Callorhinus ursinus*. Jour. Mamm., **31** (4).

Scheffer, V.B., 1950: Growth layers on the teeth of Pinnipedia as an indication of age. Science, 112.
Stejneger, L., 1896-97: The Asiatic Fur-Seal Islands and Fur-Seal Industry. Part I—IV.
Taylor, F.H.C., M. Fujinaga & F. Wilke, 1955: Distribution and food habits of the fur seals of the North Pacific Ocean. U.S. Dept. Interior, Fish and Wildlife Serv.
Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, 1959-a: Report of Japanese fur seal research in 1958. Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, special Publication, No. 6.
Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, 1959-b: Report of Japanese fur seal research in 1959. Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Manuscript report.
Townsend, C.H., 1896: Illustrations showing condition of fur seal rookeries in 1895 and method of killing seals. Part 2, Atlas, in U.S. Congress, Senate Doc., 137.
Wilke, F., 1955: Report of field activities in 1955 U. S. Dept. Inter., Fish and Wildlife Serv., unpub. report.
Wilke, F., 1953: Report of field activities in 1953. U.S. Dept. Inter., Fish and Wildlife Serv., unpub. report.
Wilke, F., 1951: Pelagic fur-seal research off Japan in 1950. U.S. Fish and Wild. Serv., Leaflet WL-338.
Wilke, F., K. Niggol & C.H. Fiscus, 1958: Pelagic fur seal investigations. California, Oregon Washington and Alaska. United States Department of Interior, Fish and Wildlife Service, unpub. report.

二枚貝のビタミン B_{12} 代謝について—I.

人工海水に添加した放射性 B_{12} のアサリによる吸収

戸 沢 晴 巳・相 良 順 一 郎

(1961 年 3 月 15 日受理)

ON THE VITAMIN B_{12} METABOLISM OF BIVALVES—I. ABSORPTION OF RADIOACTIVE VITAMIN B_{12} FROM ENVIRONMENTAL SEA WATER BY *TAPES JAPONICA*

Harumi Tozawa and Jun'ichiro Sagara*

Recently a possible function of vitamin B_{12} in the environment of aquatic organisms was discussed in relation to such phenomena as abrupt bloom of "red tide". In connection with this significant role of the vitamin, more information should be needed about the source from which the organisms can uptake this vitamin.

Existence of the vitamin found by several authors in the alimentary system of aquatic invertebrates as well as phytoplankton has made it inferable that it may be derived either from food for the animals (mainly phytoplankton) or produced by their intestinal microorganisms. With a view to elucidating these points, the little neck clam, *Tapes japonica*, has been cultivated in artificial sea water in the presence of vitamin B_{12} labeled with ^{60}Co at various concentrations. The experiments proved that the clam absorbs the vitamin from the environmental water. The measurement of the radioactivity absorbed into different parts of the clam revealed the following.

1) The radioactive vitamin B_{12} was transferred from the artificial sea water to the clam within six days (Table 1).

2) The level of radioactive vitamin B_{12} absorbed in the tissues of the clam was higher in the liver and gill than in the foot and gonad. While almost no radioactivity was detected in the intestinal tract (Table 2).

3) Fairly active absorption ability of the clam for this vitamin was suggested from high concentration factor for radioactive vitamin B_{12} in the tissues of the clam, especially in the liver (Fig. 2).

著者等の一人は，先に二枚貝の環境要素としてのビタミン B_{12} について検討を行なつたが[1]，この問題に関連して水産生物体組織に保持される B_{12} の来歴すなわち代謝経路を解明することが重要と考えられる。近年 B_{12} の研究が開発されるにつれ，陸上草食動物の B_{12} は，反芻胃内に存在する微生物に由来するものであることがほぼ明らかにされている[2]。一方水産生物の B_{12} に関しては，Ericson[3] が海藻中の B_{12} は海水中の B_{12} に起因することを述べているほか，淡水魚[4]，無脊椎動物[5]については腸内細菌ないし食餌としての植物プランクトン，ヒトデ[6] については食餌としての貝類が B_{12} の供給源といわれている。しかしこれらはいづれも 1 つの考察として提起されているに止る。

著者等はアサリ体内 B_{12} の来歴を明らかにすることを中心として，アサリの B_{12} 代謝に関する知見を得るため ^{60}Co でラベルした放射性 B_{12} を用いて研究を行なつた。上述した従来の知見から，アサリ体内の B_{12} は，海水に溶存する B_{12}，食餌（植物プランクトン），腸内微生物の 3 者に由来する可能性がそれぞれ考えら

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab. Tsukishima, Tokyo, Japan.)

東海区水産研究所業績 B 第 352 号

れる。本報においてはまずアサリが海水中の B_{12} を直接吸収する場合について実験し，興味ある事実を見出したのでここに報告する。

実験および結果

放射性 B_{12} は Abbott 社製の radiocyanocobalamin (848 μc/mg B_{12}) で，これを適宜稀釈，飼育水に混じて所要の濃度とした。飼育水は HERBST 氏の人工海水，アサリ（千葉県浦安地先）は殻長 32.8～36.0 mm のものを用いた。飼育水槽の内側にはポリエチレンシートをしき，飼育期間（6～20 日）は投餌せず，温度は 15°C に保つた。放射性 B_{12} の量は ^{60}Co の放射能から換算した*。測定はシンチレーションカウンタまたは GM カウンタで行なつた。GM カウンタで測定する場合は，試料を硝酸で液状灰化してから行なつた。

1. 放射性 B_{12} のアサリ体組織えの転移

まず基本的な問題として，飼育海水中の放射性 B_{12} がアサリ体組織に転移するか否かをみるための基礎実験を行なつた。放射能の有無を確実に検知するため，海水中の放射性 B_{12} は相当な高濃度（3,750 mγ/l）とし，この海水 400 ml 中にアサリ 3 コの割合で飼育，24 時間後および 6 日後の放射能を検した。

結果は Table 1 のごとくである。この場合海水自体の放射能は 21 cpm/0.1 ml であるから，1 日後のものの値は汚染による誤差も考慮に入れねばならないが，6 日後のものは明らかにどの組織にも放射性 B_{12} が転移していることが分る。

Table 1. Radioactivity (cpm/0.1 g of wet tissue) in *Tapes japonica* cultured in artificial sea water containing 210 cpm/ml of radioactive B_{12}.

Tissues	Culturing period	
	1 day	6 days
Foot	125～154 (144)*	508～1310 (858)**
Gill	28～ 45 (39)	160～2290 (1170)
Liver	8～ 25 (17)	—— (454)

*, ** Figures in parenthesis are the mean values from three clams for one day's culture, and six clame for six day's.

2. 組織の放射性 B_{12} 吸収量

次にアサリの各組織別に放射性 B_{12} 吸収量を見た。実験 1 の場合は飼育水中の放射性 B_{12} 濃度が極端に高いため，各組織の吸収量が正常ではないことが考慮されるので，今回は水中濃度を低くとつた。(150 mγ/l および 11 mγ/l) 普通海水中の B_{12} 濃度は数 mγ/l といわれている[7]ので，11 mγ/l のものは，ほぼ自然条件にひとしいとみなしてよいであろう。使用水量はアサリ 1 コにつき前者は 1l，後者は 2l とした。

Table 2. Absorption of radioactive B_{12} into tissues of *Tapes japonica* cultured under various conditions.

Tissues	Radio-B_{12} level (γ/100g of wet tissue)		
	A	B	C
Foot	2.0	0.06	0.3
Gill	6.5	1.2	7.7
Liver	14.5	1.2	4.2
Intestine	trace	trace	trace
Gonad	—	—	0.3

A: Cultured for 10 days at the concentration of 150 mγ/l
B: 〃 10 days 〃 11 mγ/l
C: 〃 20 days 〃 11 mγ/l

Each figure shows the meam value for two specimens of the clam.

Table 2 に結果を示す。アサリの組織別 B_{12} 含有量については肝臓，卵巣がもつとも高く，エラがこれに次ぎ，筋肉部はもつとも少くて肝臓の 1/5～1/10 程度といわれている[8]。Table 2 の値をみると肝臓に高く，筋肉（アシ）に低い傾向は自然的分布と一致している。すなわち吸収された放射性 B_{12} は割合短時間のうちに肝臓に集積する。なお，肝臓とアシの放射性 B_{12} 含有比について，実験の場合と非常に相違がみられる

* 放射性 B_{12} 分子が何等かの変化をうけることによつて ^{60}Co の放射能と放射性 B_{12} の量が一致しない場合がありうるが，これについては続報で検討する。

(Fig. 1) が，これが水中の放射性 B_{12} 濃度の差に起因するか否かは明らかでない。

エラの放射性 B_{12} 吸収量は相当高く，ある場合には肝臓を上廻つている。腸管にはほとんど全く放射性 B_{12} が検出されなかつた。

卵巣の放射性 B_{12} 吸収量は意外に低かつた。これは卵巣えの B_{12} の集積がおそいためとも見られるが卵巣の場合特に季節的変動をも考慮せねばならぬから，もつと詳細に調べる必要があろう。この他外とう膜，水管等はアシと大体同程度であつた。

3. アサリの放射性 B_{12} 濃縮

水産生物の場合，ある物質の濃縮係数（生体，組織内の含有濃度/環境水中の濃度）は，生物がその物質を吸収，蓄積する場合の積極性を示す1つの指標となり得る。Fig. 2 に 11 mγ/l の放射性 B_{12} 水中濃度での，アサリ肝臓およびアシの濃縮係数の時間的変化を示す。図から明らかなように，係数の増加は相当著しく，肝臓では 20 日間で平均 3,600（最高 5,500）に達する。このような高い値からして，アサリの B_{12} 直接吸収は相当積極的に行なわれるものと考えられる。

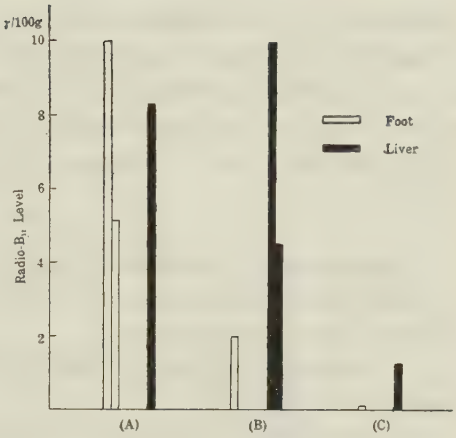


Fig. 1. Comparison of radioactive B_{12} level between foot and liver of the clam cultured under various conditions.
(A): Cultured for 6 days at the concentration of 3750 mγ/l
(B): Cultured for 10 days at the concentration of 150 mγ/l
(C): Cultured for 10 days at the concentration of 11 mγ/l

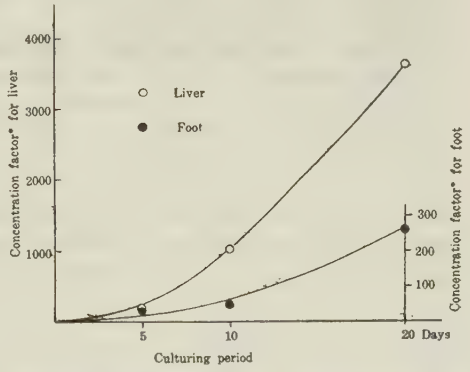


Fig. 2. Concentration of radioactive B_{12} by *Tapes japonica*.

$$* : \frac{\text{radioactivity of radio-}B_{12}\text{ contained in a gram of the tissue}}{\text{radioactivity of radio-}B_{12}\text{ contained in a ml of the water}}$$

考　　察

従来，水産動物の組織に保持されているビタミン B_{12} の供給源として海水中の B_{12} を考え，これを直接に吸収するものとする見解は見当らないが，本報によつて，少なくともアサリは海水中から B_{12} を直接に，しかも相当積極的に吸収することは明らかにされたと考える。この場合多少論議の残る点は，この種の実験において，海水に溶解している以外の B_{12} 源を考えなくてよいか，ということであろう。そしてその1つとして，海水中の微生物（実験に供したアサリに附着していたと考えられる）が，海水中より放射性 B_{12} を吸収し，これがアサリによつて摂取されたのではないか，とする考え方がある。しかし，その場合には，まづなによりも腸管内の放射性 B_{12} 含有量が高くなる筈である。しかるに本報の実験結果では腸管内にはほとんど放射性 B_{12} は検知されて居らない。したがつて海水中の微生物あるいは腸内細菌を経て転移することは考えられない。すなわち，この実験の場合，アサリは溶存する放射性 B_{12} を直接に吸収した，と考えるのが妥当であろう。

この場合吸収に当つての経路，機作等は明らかでない。しかし魚類等でよく知られているエラのイオン吸排能と，一定時間内の接しよく水量はエラが圧倒的に多いことを考慮すれば，少なくとも吸収に際し，エラが重要な役割を果すことは考えてよいであろう。本報の実験結果ではエラの放射性 B_{12} 量が相当顕著であることは，以上と関連して興味深い。

濃縮係数の値およびその時間的増加の傾向から，アサリの B_{12} 直接吸収が相当積極的に行なわれると考えることができるが，これはもちろん直接吸収のみがアサリの B_{12} 保持機構であるということではない。この点に関しては当然他の B_{12} 供給経路，たとえば食餌による B_{12} の摂取などと比較考察されねばならない。しかしながら少なくともアサリの B_{12} 直接吸収は，単なる実験的事実ではなく，1つの生理的機構としてアサリの B_{12} 保持に関し，無視しえない程度の寄与をなしていると推定しうるであろう。

要　　約

1. 飼育海水に添加した放射性 B_{12} は，速かにアサリ体組織に移行する。

2. 放射性 B_{12} の含有量が最も高いものは肝臓およびエラで，アシ，卵巣，外とう膜等では低い。また腸管にはほとんど全く認められなかつた。

3. アサリ体組織，特に肝臓における放射性 B_{12} の濃縮係数は著しく大で，相当積極的な吸収，集積が行なわれていることを示した。

4. 以上から飼育海水中の放射性 B_{12} のアサリ体内転移は，直接吸収によるものであることを明らかにした。またアサリ体組織のビタミン B_{12} 保持に寄与する直接的吸収機能の重要性につき考察を加えた。

文　　献

1) 相良・築瀬：日水試，**24**，456 (1958).
2) 佐橋編：ビタミン B_{12} と APF，129，南江堂 (1955).
3) ERICSON, L. E.: Chemistry and Industry. No. 34, 829 (1952).
4) 橋本：日水誌，**19**，899 (1953).
5) MAXWELL, B. E.: J. Fish. Res. Brd. Can. **9**, 164 (1952).
6) 築瀬：日水誌，**19**，1200 (1954).
7) 柏田他：日水誌，**22**，637 (1957)；**23**，450 (1957).
8) 相良：未発表.

二枚貝のビタミン B_{12} 代謝について—II.

アサリの体内および人工海水中での放射性 B_{12} の安定性

戸沢晴巳・相良順一郎

(1961 年 3 月 15 日受理)

ON THE VITAMIN B_{12} METABOLISM OF BIVALVES—II. STABILITY OF RADIOACTIVE VITAMIN B_{12} IN TISSUES OF *TAPES JAPONICA* AND IN ARTIFICIAL SEA WATER

Harumi Tozawa and Jun'ichiro Sagara*

In the preceding paper, radioactive B_{12} absprbed in tissues of the little neck clam (*Tapes japonica*) was calculated directly from measured radioactivity. This calculation, however, cannot be established if radioactive B_{12} is decomposed and the labeled part loses B_{12} activity. Therefore, the stability of radioactive B_{12} in tissues of the clam and in artificial sea water has been examined in the present work.

1) Extracts from body tissue of the clam which absorbed radioactive B_{12} were prepared and spotted on the paper for chromatography using sec. butanol-H_2O solution as developer. The paper was cut into ten pieces or so, each 1 cm wide, in parallel with the original line. Radioactivity and B_{12} activity on *Euglena gracialis* were measured for these pieces (Fig. 1).

The results showed that ^{60}Co detected in the chromatogram existed as a constituent of certain substance which had a biological activity similar to that of vitamin B_{12}. The fact suggests that radioactive B_{12} absorbed by the clam was not decomposed or, at least, maintained the activity for *Euglena gracialis* (Table 1).

2) When radioactive B_{12} was added to artificial sea water and was kept at 15°～20°C under the shelter from the daylight for 15 days, the radioactivity and the B_{12} activity on *Euglena gracialis* were found maintaining the initial levels (Table 2).

前報[1]において，アサリが環境水よりビタミン B_{12} を直接に吸収することを，放射性 B_{12} を用いて明らかにしたが，その実験方法としてアサリの各組織に含有される放射能を測定し，これから直ちに放射性 B_{12} 量を求めた。この場合もし放射性 B_{12} が，アサリに吸収される前後において分解等により変化し，ラベル部分が B_{12} 機能を持たぬ形（たとえばコバルトポルフィリン，甚だしい場合コバルト分子）になつていることがあると，放射能測定値から B_{12} 量を求めることは無意味となる。そこで 2 週間程度の実験期間における放射性 B_{12} のアサリ体内，および人工海水中での安定性について検討した。

実験及び結果の考察

1. アサリに吸収された放射性 B_{12} の安定性

アサリに吸収された放射性 B_{12} の変化の有無をみるには，アサリ体内で，^{60}Co が B_{12} 機能をもつ形で存在するか否かを知ればよい。そこでアサリ体組織の抽出液についてペーパークロマトグラムをとり，B_{12} に

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab. Tsukishima, Tokyo, Japan.).

東海区水産研究所業績 B 第 353 号

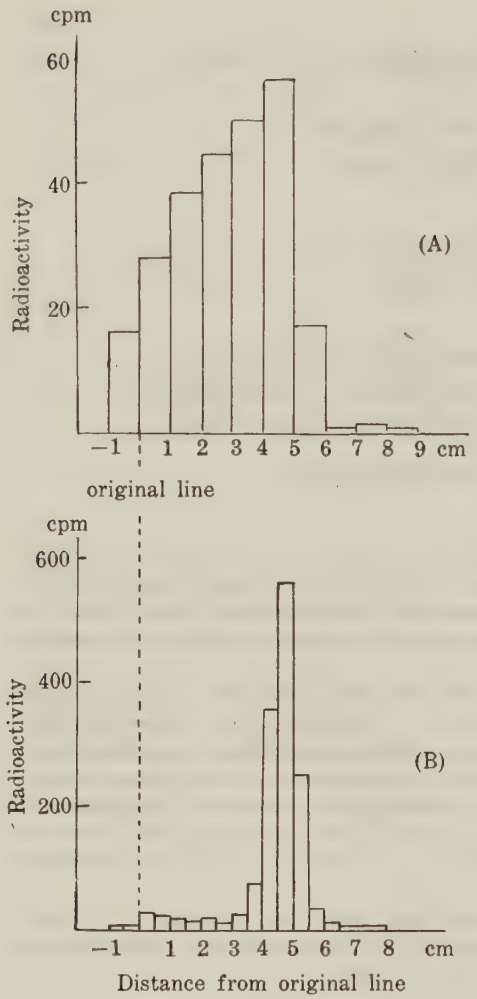


Fig. 1. Distribution of radioactivity on chromatograms when tested for the clam sample and for radio-B_{12} solution respectively.
(A): Extract from *Tapes japonica* which absorbed radio-B_{12}
(B): Control radio-B_{12} solution

該当する展開部分に ^{60}Co 放射能がゆくか否かを検する方法をとつた。

前報の場合と同様にして放射性 B_{12} を添加した人工海水 (100 mγ/*l*) 12*l* に対し千葉県浦安地先アサリ 10 コ (殻長 32.0～36.5 mm) を入れ，通気しながら 15°～22°C で 12 日間飼育した。このアサリのムキミ部分 3 コ分 (3.1g) をよく磨砕し，水 30cc を加えて湯せんで 10 分間加熱，冷却後 5 m*l* の 20% TCA を加えて沪過，沪液はエーテルと 3 回ふつて TCA を除き，湯せん上で蒸発濃縮して 0.5cc とする。(予備実験で TCA 処理が B_{12} 測定に影響しないことを確めた。) この 0.02cc を 2×40cm の東洋沪紙クロマト用 No. 51 につけ，アンモニア性 *sec*-Butanol (*sec*-Butanol : 水 : conc NH_4OH : KCN = 75 m*l* : 24 m*l* : 1 m*l* : 0.01g) で 24h (15°C) 展開した。展開後，原線から 1cm づつ切りとり，各部分の放射能を測定した。(GM カウンタで沪紙ごと測定) 同時にこの実験に用いた放射性 B_{12} 原液 (0.93 μc/m*l*) についても同様の操作を行なつて (0.5 cm づつ切りとる) 比較した。

Fig. 1 に結果を示す。沪紙につけた試料は 0.05 m*l* で 610 cpm (244 cpm/0.02 m*l*) であつたから，クロマトグラフィー操作での loss はほとんどないと考えてよい。試料，原液とも R_f は約 0.18 と計算される。この条件における B_{12} の R_f は約 0.19 といわれている[2] から，大体一致すると考えてよい。しかし試料の場合 (Fig. 1-A) 分離が非常に不明確で，これのみでは B_{12} 以外の放射性のものが存在するか否か明らかでない。

そこで次にこの点を検討するため，沪紙各切片の B_{12} 量を測定し，放射能の分布と対照した。Fig. 1-A の −1～1cm を I，1～3cm を II，3～6cm を III，6～9cm を IV とし，それぞれ試験管に入れ，水 20cc を入れて湯せんで 5 分間加熱抽出し，抽出液を適宜稀釈後 Euglena 法[3] で B_{12} 量を測定した。(残渣としての沪紙切片にはほとんど放射能は残らない)

結果を Table 1 に示す。これから明らかなように，各切片における B_{12} 測定値/放射能の値はよく一致し，放射能のない IV 部には B_{12} も全く検出されない。すなわち，どの

Table 1. Ratio of vitamin B_{12} amount against radioactivity on each section of chromatographed paper tested for the clam sample.

Section	Distance from original line (cm)	Radioactivity (cpm)	B_{12} amount (mγ)	B_{12} amount Radioactivity (mγ/100 cpm)
I	−1～1	44	1.5	3.4
II	1～3	82	2.5	3.1
III	3～6	124	3.6	2.9
IV	6～9	1	0	—

切片においても ^{60}Co の放射能は一様に B_{12} 機能をもつ形で存在していることが判る。

B_{12} 類似化合物で Euglena に対し生育作用をもつものは，一般に FA, FC および pseud B_{12} であるとされている[4]。これらは *sec*-Butanol-水系の沪紙クロマト分離ではいづれも B_{12} より R_f が小で，相当明瞭に B_{12} と分離できるといわれる[2),5)]が，われわれの実験ではクロマト分離が不充分なので，Table 1 の III 以外の沪紙切片における B_{12} 測定値は，B_{12} のみによるものか，あるいはこれら B_{12} 類似化合物をも含むものかは明らかでない。しかしながら少なくとも，アサリに吸収された放射性 B_{12} は，その大部分が B_{12} そのままあるいは B_{12} 機能をもつ化合物として存在することが明らかにされたと考えられる。

試料の沪紙クロマト分離が明確でなかつたのは，放射能測定操作に必要な程度まで抽出液を濃縮したので物理的に tailing がひどかつたためであろうと思われる。tailing を防ぐ目的で，抽出に 50% アルコールあるいは純アルコールを使用してみたがうまくゆかなかつた。この点を解決するためには沪紙クロマトによるよりも，イオン交換分離法を確立することが必要であろう。また，B_{12} 定量には，B_{12} に対する特異性の強い Ochromonas を用いるのが有効であると思われる。

2. 人工海水に添加した放射性 B_{12} の安定性

放射性 B_{12} を 600 mγ/*l* になるように加えた人工海水 (112 cpm/m*l*) 各 100 m*l* をポリエチレンシートをしいたビーカーに入れ，一方は直射日光をさけた実験室内（前報の飼育場所と同一）におき，他方は暗室に放置した。温度は実験室で 15°～22°C，暗室で 16°～19°C。このものにつき 0, 5, 15 日の放射能および B_{12} 量をそれぞれ測定した。蒸発による減量は蒸留水で補足した。B_{12} 定量は No. 4 B の沪紙で沪した沪液 1 m*l* を 50 倍に稀釈してから，Euglena 法で行なつた*。

Table 2 から明らかなように人工海水に添加した放射性 B_{12} は，少なくとも 15 日間 B_{12} 機能を失わず，放射能にも変化がない。

Table 2. Stability of radioactive B_{12} in the artificial sea water kept in diffused light and in the dark.

Period of experiment (days)	In diffused light		In the dark	
	Radioactivity (cpm/m*l*)	B_{12} activity (mγ/*l*)	Radioactivity (cpm/m*l*)	B_{12} activity (mγ/*l*)
0	112	560	112	560
5	113	670	111	600
15	114	600	112	520

柏田等[6]は，散光の下においても無色ガラスびんに貯えた海水中の B_{12} が，相当程度減少するとしている。われわれの場合は人工海水であり，またポリエチレンシートをしいてあるために光の影響をさけ得た，とも考えられるが，なお柏田等と異なる結果を得た点については不明である。飼育実験の条件により近づけるため，アサリ飼育水（放射性 B_{12} を含む）について放射能と B_{12} 量を測定し，これ等の値から放射性 B_{12} の変化の有無を知ろうと試みたが，この場合アサリはその保持している B_{12} を水中に放出し，水中に B_{12} (非放射性) が出現することが明らかとなつたため，この試みは成功しなかつた。

結果の要約

1) アサリに吸収された放射性 B_{12} は，そのまま，あるいは B_{12} 機能をもつ化合物として存在することを明らかにした。

* 放射性 B_{12} の濃度をもつと低くし，セロファン透析を行なつてから測定する予定であつたが，予備実験の結果，B_{12} はセロファン (Visking 社製) 透析によつて失われることが明らかとなつたので，稀釈により塩の阻害を防ぐことにした。

2) 人工海水に添加した放射性 B_{12} は，直射日光をさけた実験室および暗室内で，少なくとも 15 日間 (15°～22°C) B_{12} 機能を失わないことを知つた。

文　　献

1) 戸沢・相良：日水試，**27**，785-788 (1961)
2) 多田：ビタミン，**19**，221 (1960).
3) 築瀬：日水試，**17**，389 (1952).
4) COATES, M. E. and FORD, J. E.: The Biochemistry of Vitamin B_{12}; Biochemical Society Symposia (Cambridge) No. 13, 36 (1955).
5) KON, S. K.: ibid. No. 13, 17 (1955).
6) 柏田他：日水試，**24**，591 (1958).

致死条件が魚肉蛋白におよぼす影響—II.
即殺および苦悶死コイ肉蛋白の凍結による変化

右田正男・大竹茂夫

(1960 年 12 月 23 日受理)

INFLUENCE OF DIFFERENT LETHAL CONDITIONS UPON FISH MUSCLE PROTEIN—II.
DENATURATION OF CARP MYOSINS BY FREEZING AND FROZEN STORAGE.

Masao Migita and Shigeo Otake*

Effect of freezing and cold storage upon the extractability and salting-out behavior of muscle protein was examined, using carp killed in two different ways; one was instantly put to death by beheading and the other was beheaded after allowed to struggle in air for several hours.

Fillets taken from these two groups of carp were frozen at −15°C and stored at this temperature for a period varying from 2 to 14 days. Before freezing and at each different time of cold storage, myosins were extracted from these fillets with 0.6M KCl (pH 6.6), precipitated by dilution, and the amount was measured. With isolated myosins salting-out behavior toward ammonium sulfate was determined at pH 6.9 and at the temperature of 0°C.

Extractability Myosins were always extracted greater in amount from death-after-struggle group than from instant death group throughout the period of the present experiment. No significant difference, however, in the ratio of amount of myosins (M) to salt extractable protein (L), was noticed between the two groups. After frozen storage of 10 days, a slight diminution in the values of L and M was observed in the muscle of instantly killed fish, but it was not appreciable for death-after-struggle group within the limited duration of the present test. Meanwhile, the ratio $M : L$ seemed to decrease somewhat in both groups on prolonged storage (Table 1).

Salting-out Curves Around the range of 30~40% (v/v) saturation of ammonium sulfate in the salting-out curves for either group, there was found a dominant peak, which presumably represented myosin and actomyosin. With fresh fillet before freezing, this peak was more prominent for the instant death group than for the other.

However, by freezing and subsequent frozen storage, the pattern of the curves for instant death group turned out close to those of unfrozen fillet of death-after-struggle group, and inversely the pattern of the latter group became kin to those of the former group that was not frozen. This will be obviously perceived from the mode of slope and fall in the s-c curves in the range of 30~40% saturation of ammonium sulfate (Figs. 1 and 2).

In another series of experiments similarly conducted for isolated myosin gel, the results given were not quite the same as obtained for the fillets. The salting-out curve of the gel from fish killed after struggle became analogous to that of fresh, unfrozen gel from instant death group, just as seen in the case of the fillets. But the curves of frozen myosin gel from instant death group was not altered by freezing process and cold storage (compare Figs. 1, 2 and Figs. 3 and 4).

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab.).

東海区水産研究所業績 B 340 号

It is notable in Figs. 1~4 that there was found concentration range of ammonium sulfate in which components salted-out decreased in amount with increasing concentration as the result of freezing and subsequent storage. This means that a part of components which were salted-out at concentration c_1 remained in solution in the range of higher concentrations between c_1 and c_2. This effect will be valid for either fillet or isolated myosins gel.

Actin fraction in the salting-out pattern In the previous paper†, it was shown with fresh fillets that actin fraction appeared in the salting-out pattern of myosin fraction from carp killed after struggle, but the corresponding fraction was absent in the case of carp put to an instant death. In addition, it was mentioned that this actin fraction would not appear, if the extraction of myosins from carp killed after struggle was carried out in the presence of ATP.

In the present work, it was found that when the fillets were frozen and kept for 2 days or 6 days, a prominent peak presumed as actin fraction, appeared also in the case of carp put to an instant death. However, with prolonged storage, this peak became far less prominent, though it had not disappeared.

Actin fraction in the salting-out patterns of myosins from carp, killed after struggle, hardly underwent the change in 2 day frozen storage, but in 6 day frozen storage, a sharp peak did appeared in the range below 10% saturation of ammonium sulfate. And, furthermore, decrease in amount of a component salted-out was observed between 10% and 20% saturation of the salt. Prolonged frozen storage seemed to shift the range from low saturation of ammonium sulfate to higher, in which decrease in salting-out was ready to occur. When isolated myosins gel was frozen and subsequently stored, actin fraction was never or hardly observed in either group of fish.

Addition of ATP was found effective to inhibit the appearance of actin fraction in the fillet from death-after-struggle group which was stored frozen one day, but not for the fillet kept frozen for two days (Figs. 5 and 6).

† Influence of death conditions upon muscle protein-I. Composition of myosins from carp killed instantly and in anguish. MIGITA, M., OTAKE, S.: This Bulletin, **26**, 140 (1960).

NIKKILÄ および LINKO[1] は死後硬直中に凍結した Baltic herring の肉と解硬直後凍結したものとをくらべ，解凍後前者は後者よりも短時間に，塩溶性蛋白窒素およびミオシン区窒素の減少することをみ，凍結されるときの魚肉の物理的状態がことなれば凍結中肉蛋白のこうむる影響も異なることを指摘している。最近われわれ[2]は，即殺されたか，苦悶死したかで，コイのミオシン区蛋白の性状が異なること，すなわち，即殺区の塩析曲線では，ミオシンおよびアクトミオシンの山が主体をなしているが，苦悶死区の曲線には，このほかアクチンの山が認められることを見出した。そこで今回は，この致死条件の異なるコイ肉を凍結した場合，それぞれのミオシン区蛋白の性状が，さらにどうちがってくるかをみるために，塩溶液による抽出度，硫安に対する塩析現象をしらべた。

試料および実験方法

試料 魚種：コイ，時期：12 月 3 日および 4 日，体重：800~1000 g.

即殺区 魚商の水槽からとりあげ，直ちに頭をおとし，氷冷して実験室にもち帰えつたもの。

苦悶死区 空気中に 3~4 時間放置後，頭を落す。

肉の凍結 即殺，苦悶死各区のコイをそれぞれ三枚におろし，血合肉を除き，白肉 30 g づつ 5 組をとり，一組は凍結前の試料とし，残りの 4 組は −15°C で凍結し，そのまま貯蔵し凍結試料とした。

凍結肉よりミオシン区蛋白の分離 凍結肉を 0°C の氷水中に 3 時間浸し 5mm 角に切り，冷 0.6 M KCl 10 倍量で 2 分間抽出，30 分間遠心分離 (0~1°C, 3000 r.p.m.)，上澄液を氷冷かくはんしながら，2 倍量の氷冷水を滴下し，沈澱するものをミオシン区蛋白とした。

塩析分析　前報と同じく，SNELLMAN および TENOW[3] の方法に準じ，ミオシン区蛋白を KCl-りん酸塩 buffer (0.1M K_2HPO_4/0.5M KCl, $1l$ + 0.1M KH_2PO_4/0.5M KCl, $0.4l$; pH 6.9) にとかし，これに一連の濃度の硫安を添加し平衡に達せしめた後，溶存している蛋白の量をはかり，溶存蛋白～硫安濃度曲線 (*s-c* 曲線) を作り，これから塩析曲線を求めた。

結　　果

1 即殺および苦悶死コイ肉の凍結貯蔵中におけるミオシン区蛋白の変化

−15°C で凍結したコイ肉をその温度に 2 日，6 日，10 日，14 日冷蔵したときの蛋白の変化をみた。外観的には即殺，苦悶死両区とも，凍結 2 日で肉に弾力のおとろえが，6 日以降は軟化が認められた。

1-1 *ΔP-P* 含量

試料とした各肉の *ΔP-P* の含量は次のようであつた。

	凍結前	凍結 2 日
即 殺 肉	60mg%	0
苦 悶 死 肉	0	—

1-2 溶出蛋白量

10 倍量の 0.6M KCl で抽出される蛋白を塩溶性蛋白，このうち 0.2M KCl で沈澱する部分をミオシン区蛋白として，即殺肉および苦悶死肉の凍結保存中における溶出蛋白量の変化をみると，Table 1 のようになる。

Table 1. Change in extractability of "myosins" during freezing and cold storage.

Group of carp	Time of frozen storage (day)	Salt extractable protein (*L*) (mg. Pr. N/g muscle)	"Myosins" (*M*) (mg. Pr. N/g muscle)	*M*/*L* (%)
Instant death	Before freezing	21.5	14.5	67.4
	2	21.4	15.2	71.1
	6	21.5	14.3	66.4
	10	20.6	13.3	64.3
	14	19.0	12.2	63.8
Death-after-struggle	Before freezing	24.3	16.5	68.0
	2	22.6	15.5	68.6
	6	24.3	15.8	64.7
	10	23.6	15.1	63.6
	14	25.1	16.2	64.4

表から次のようなことがいえる。

(i) 致死条件と溶出蛋白量の関係　苦悶死区では，即殺区に比し，筋肉 1g から抽出される蛋白の量もミオシン区蛋白の量も明らかに多い。しかし塩溶性蛋白中のミオシン区蛋白の割合は，両区の間に殆んど差がない。

(ii) 凍結日数と溶出蛋白量の関係　凍結日数が 10 日以上になると，即殺区では塩溶性蛋白の量もミオシン区蛋白の量も幾分低くなるように見える。Table 1 に示したこの二つの蛋白の値は，その都度の試料 1g に対するものである。従つて凍結冷蔵中に試料が水分を失ない，目減り（普通 5% 以下）を生ずることを考えると，凍結 10 日以上の試料では，実際の溶出蛋白量は，表の値よりも幾分小さい。一方，苦悶死区では少なくとも 2 週間程度の凍結冷蔵では，溶出蛋白量は殆んど変化が見られない。溶出蛋白中のミオシン区蛋白の割合は，即殺区でも苦悶死区でも，凍結が長びくと，僅かではあるが減つていく傾向がみられる。

1-3 硫安による塩析

a. 溶存曲線（*s*～*c* 曲線）

硫安の濃度いかんで溶存しているミオシン区蛋白の量がどうかわるかを，溶液の吸光度の変化でみると，Fig. 1 のような結果が与えられた。この曲線を溶存曲線とよぶことにする。実験の精度からいって，曲線のこまかい起伏を論ずることは意味がない。ここで重要なのは曲線の傾向である。曲線はいずれも全体としては下降曲線であるが，ある点で特に大きく下るもの（例：凍結前の即殺肉）と，そうでないもの（例：凍結前の苦悶死肉）とがあり，また途中はつきりとした山や谷の認められるもの（例：凍結2日の即殺肉，凍結10日の苦悶死肉）もある。このような点から Fig. 1 の曲線をみると，致死条件と凍結日数によつて溶存曲線に面白い相異のあることがわかる。総括的にいうと，凍結前の肉では，致死条件にかかわらず，曲線にはつきりした山や谷の認められることはない。致死条件のちがいは曲線の形と傾きにあらわれている。すなわち，即殺，苦悶死いずれの場合も曲線にはある点で急に下る部分があるが，即殺区ではこの部分が大きく，かつその前後の傾斜はごく小さく，ほぼZ字形をしている。一方，苦悶死区では，曲線が急に下る部分は僅かであり，またその前後の曲線の傾きは，即殺肉の場合に比べると大きく，曲線全体としては，だらだらと下つていく感じである。

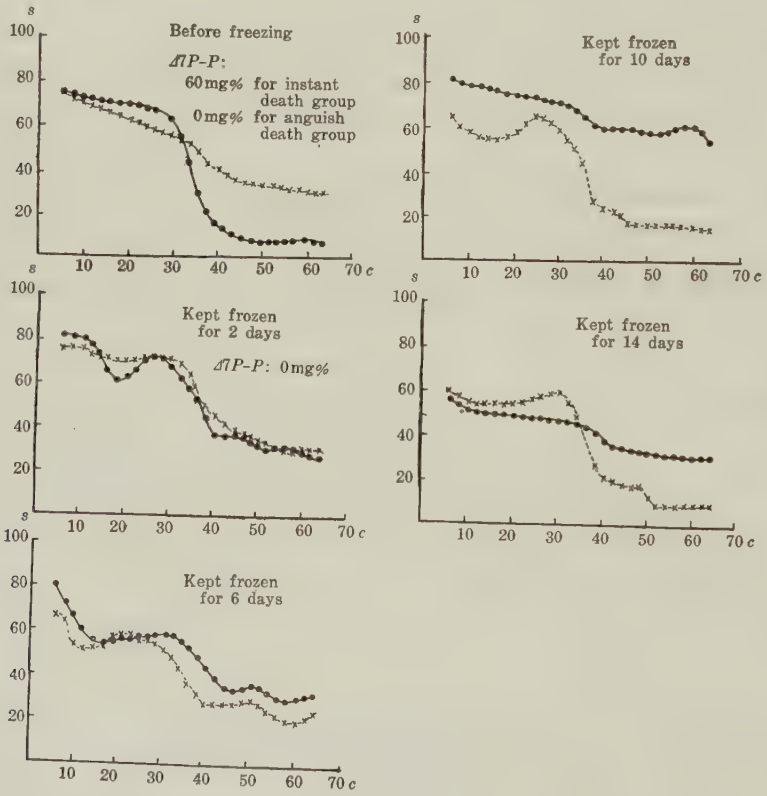


Fig. 1. Variation in salting-out behavior of myosins from carp killed differently, frozen and stored at −15°C. (Varying amounts of ammonium sulfate were added to the myosins dissolved in 0.5M KCl-phosphate buffer and brought to equilibrium; then myosins remaining dissolved were determined).
-•—•- carp put to instant death, *--*- carp killed after struggle.
s: the extinction at 275 mμ.
c: per cent in volume of saturated ammonium sulfate.
Equil. temp.: 0°C. Equil. pH: 6.9. Time for equil. 18 hrs.

ところが肉が凍結されると，曲線にはつきりとした変化があらわれる。まず著しいことは，即殺区では凍結2日で，苦悶死区では凍結6日で，曲線にはつきりした山が現われることである。つぎに曲線が大きな下降を示す硫安濃度約 30～45% 飽和に相当する部分をみると，両区とも凍結2日で変化が現われはじめている。すなわち即殺区ではこの部分の傾斜はややゆるやかに，その長さは小さくなり，苦悶死区では反対に，この部分の下降は大きく，かつ急になつている。そして凍結6日では両区の曲線はほとんど同じような形を示し，凍結 14 日では，苦悶死群の曲線に，かなりはつきりした山の認められることを除くと，即殺区と苦悶死群の曲線が凍結前と全くいれかわつた型になつている。ある点で溶存曲線が急に大きく下ることは，その硫安濃度で著しい塩析がおこることを示し，曲線の途中に上昇部のあらわれるのは，その区域では硫安の濃度がますと，かえつて塩析されがたくなることを示す。これらの関係は Fig. 1 の各曲線から，$\Delta s/\Delta c$ と c との関係，すなわちそれぞれの硫安濃度で塩析される成分の量的関係を示す塩析曲線 (Fig. 2) を求めるとさらに明らかになる。

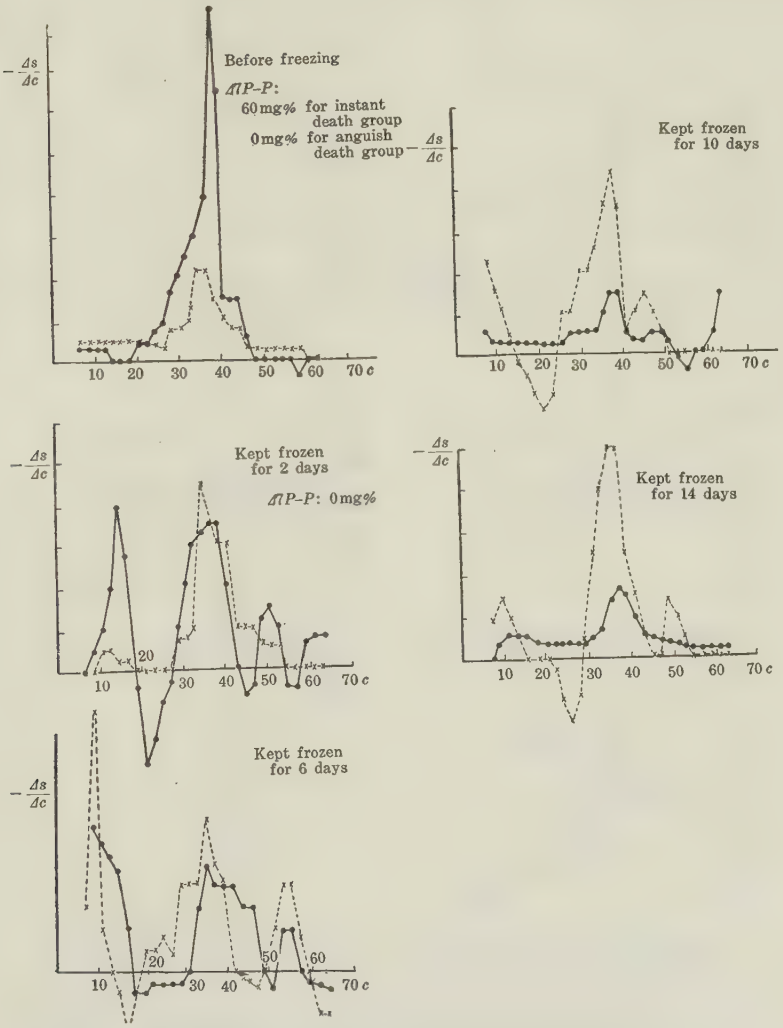


Fig. 2. Salting-out patterns derived from Fig. 1.
$\Delta s/\Delta c$: the differential extinction as a function of concentration.

b. 塩析曲線

筋肉の主な構成蛋白の硫安に対する溶解域（硫安の % 飽和度 v/v）は，マサバ筋肉について一般に認められているところ[3]によると，アクチン 9～20%，アクトミオシン 28～32%，ミオシン 32～45%，トロポミオシン 55～64% である。この値が，コイの場合にもあてはまるとすると，Fig. 2 から次のようなことがいえる。

(i) Fig. 2 の各曲線を通じていえることは，硫安の 30～45% 飽和の間にはつきりした塩析点を示す成分の認められることである。これは，アクトミオシンとミオシンからなると推定される。この山は凍結前の肉では，即殺区の方が，苦悶死区のものより大きいが，凍結 2，6 日では，両者はほぼ等しくなり，凍結 10，14 日では，苦悶死区の方がかえつて大きくなつている。

(ii) 硫安の 10～20% 飽和で析出し，アクチンと推定される成分の山は，凍結前の即殺区ではほんと無視できる程度であるが，凍結の初期（2 日，6 日）には著しくまし，塩析される主な成分の一つとなつている。しかし，凍結 10 日，14 日では，この山は著しく小さくなる。ただし消えさることはない。

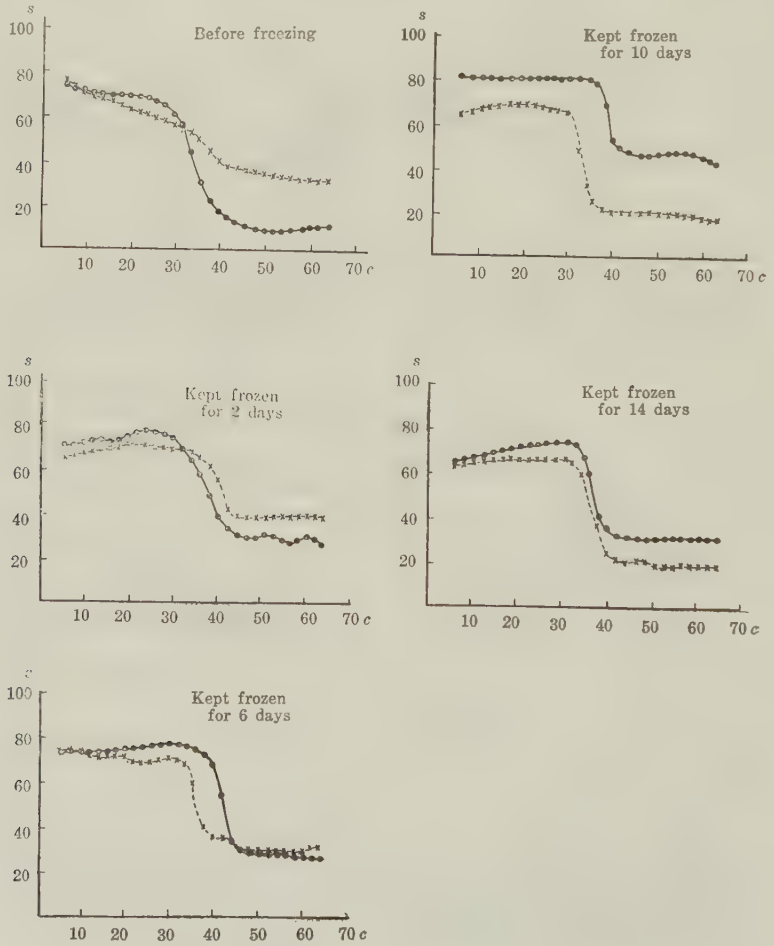


Fig. 3. Variation in salting-out behavior of isolated myosins gel during freezing and subsequent frozen storage at −15°C. (Myosins used here were isolated from the same fish as tested in experiments of Fig. 1) Conditions as in Fig. 1.

一方，苦悶死区では，即殺区の場合と異なり，この山は凍結前から小さいながらはつきりとその存在が認められており，かつ凍結してもすぐには（凍結2日）変化しない。その上，凍結6日では，硫安の 7～10% 飽和の区分に鋭い山が現われ，10～20% 飽和の間では，塩析される蛋白の減少，すなわちそれより低濃度で塩析されていた蛋白の一部が，析出されずに溶液中に止まる（Fig. 1 では曲線に山として，Fig. 2 では曲線が横軸の下に現われる）という結果がえられている。

(iii) 塩析される蛋白の量が，硫安のより高い濃度区分でかえつて減少する現象は，肉の凍結によつて，ミオシン区蛋白におこる変化の一つであるらしく，即殺，苦悶死いずれの場合にも見られる。しかし，この現象の現われる硫安濃度の区域や塩析量の減る度合は同じではない。すなわち，この現象が即殺区にはつきりと認められるのは，凍結2日，硫安濃度 20～30% の区域であるが，凍結6日になるとかなり弱まり，凍結 10 日以上になると，殆んど認められなくなる。一方，苦悶死区では凍結2日の試料には認められず，6日以後になつて現われてくるが，塩析量がへる硫安の濃度区域は，凍結6日で 10～20%，凍結 10 日で 15～25%，凍結 14 日で 20～30% と，次第に濃度の高い方に移つていくようにみえる。なお，凍結6日には 50～60% の区域にも塩析量の減少が認められる。

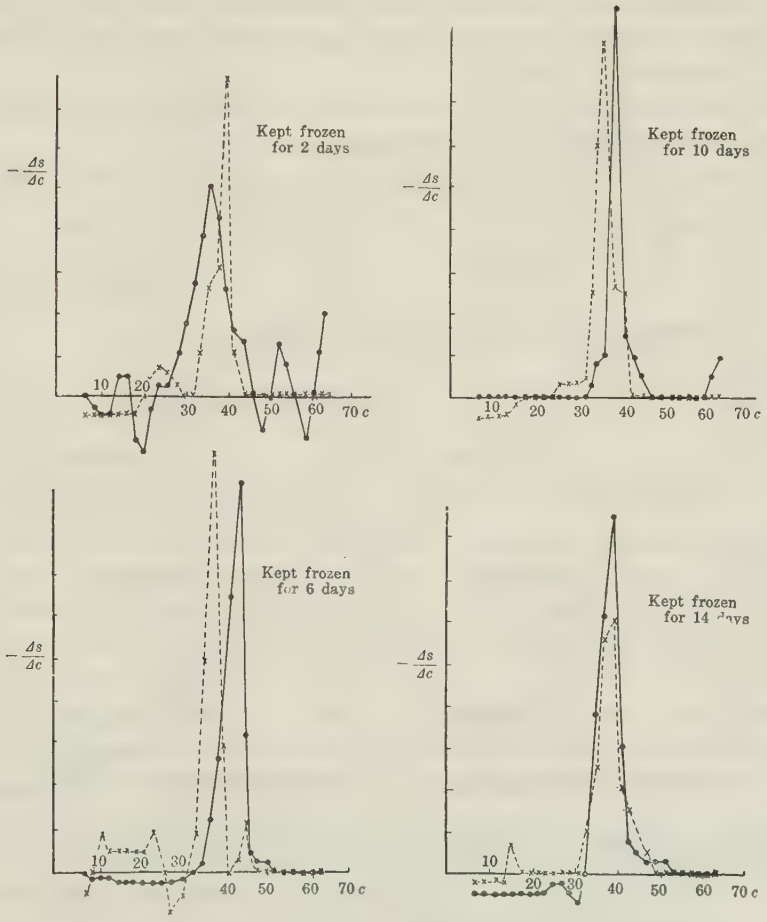


Fig. 4. Salting-out pattern derived from Fig. 3.

2 分離したミオシン区蛋白を凍結した場合の変化

実験1に用いた同じ即殺および苦悶死肉からミオシン区蛋白ゲルを分離し，実験1と同じ条件の下に凍結冷蔵して，Fig. 3～4 に示す結果をえた。

(i) 凍結後の s～c 曲線 (Fig. 3) の形はいずれもZ字形である。凍結によつて苦悶死区の曲線は，凍結前の即殺区の曲線に近づく。この点筋肉として凍結した実験1の結果と似ている。しかし，実験1の場合と異なり，凍結によつて即殺区のZ字形曲線が崩れて，凍結前の苦悶死の曲線に近づいてくるということはない。

(ii) 実験1の場合と同じく，致死条件に関せず，凍結後の曲線には，硫安のある濃度で塩析量の減少がおきていることを示す部分がある。しかし，その程度は実験1の場合ほど著しくはない。

(iii) 肉として凍結したときは，即殺区の曲線にアクチンと推定される区分の出現がみられたが，ミオシン区蛋白ゲルを凍結した場合には，即殺区にアクチン区分を認めることはできなかつた。

3 ATP 添加の影響

前報にのべたように苦悶死したコイ肉に微量の ATP を加えて抽出すると，えられたミオシン区蛋白の塩析曲線は，アクチン区分を示さず，この点に関する限り，苦悶死型の肉を即殺型の肉に近づけたような効果がある。そこで凍結された苦悶死肉の場合どうなるかを，抽出剤 100 ml あたり 10 mg の ATP を加えて抽出したミオシン区蛋白についてしらべた。

結果は Fig. 5～6 に明らかなように，凍結1日の苦悶死肉では，ATP の添加は，鮮肉の場合と同じような効果を示すが，凍結2日の肉に対しては，その効果は認められなかつた。

また，ATP を添加して抽出すると，塩析される蛋白量の減少がおこらなくなる場合（凍結1日および2

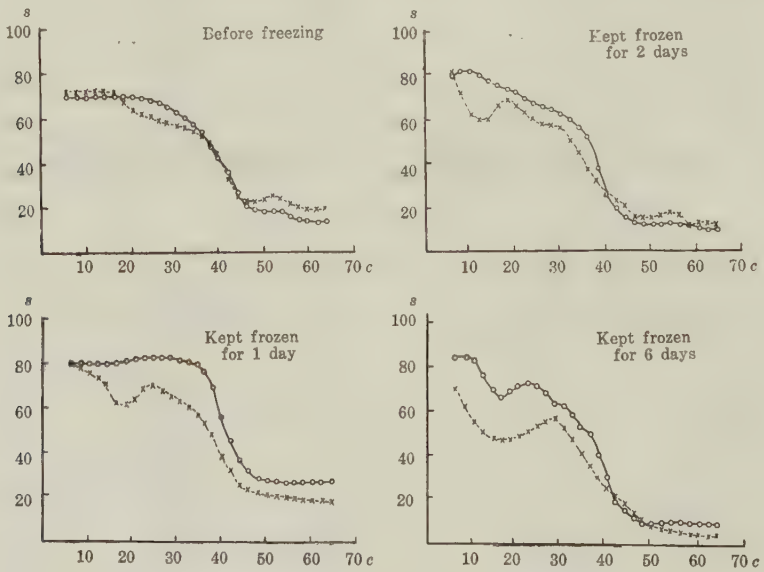


Fig. 5. Influence of ATP on salting-out behavior of myosins from carp killed after struggle, frozen and kept at −15°C.
-o—o- myosins were extracted in the presence of ATP 10 mg per 100 ml of the extractant.
-*--*- control; extraction was carried out without adding ATP.
Other conditions are the same as in Fig. 1.

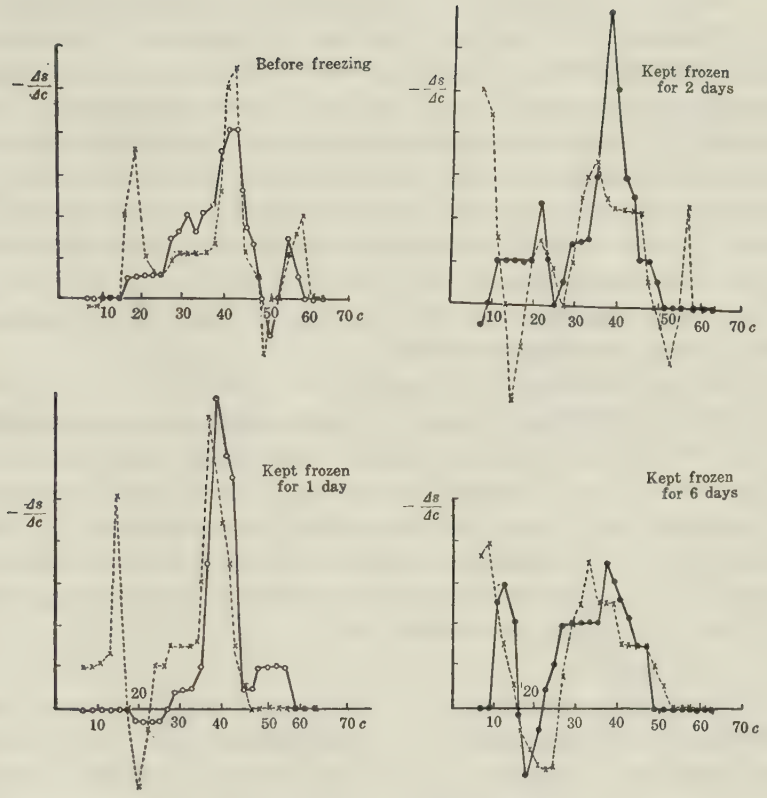


Fig. 6. Salting-out patterns derived from Fig. 5.

日）もあつたが，そうでない場合（凍結6日）もある。

考　　察

凍結によるミオシン区蛋白の変性

即殺，苦悶死いずれの区でも，肉を凍らした場合（実験1），凍結2日で，溶存曲線と塩析曲線に大きな変化が現われ，凍結 14 日では，両区の曲線がいれかわつたような結果 (Fig. 1～2) がえられた。例えば凍結前典型的なZ字形であつた即殺区の溶存曲線は，だらだら形となり，苦悶死区では，反対にだらだら形からZ字形に近くなつた。きわだつた変化といえるが，果してこれが凍結による変化の特徴といえるかどうかについては，なお検討を要する点が多い。

第一に肉として凍らした場合（実験1）と，分離したミオシン区蛋白ゲルを凍らした場合（実験2）とで，結果が必らずしも同じでないことである。例えばコイの片身はそのまま凍らし，他の片身からはミオシン区蛋白ゲルを分離して凍らすと，苦悶死区の溶存曲線は，いずれの場合も凍結がつづくにつれ，だらだら形からZ字形にかわつているが，即殺区の曲線は，肉を凍らした場合Z字形のものがだらだら形に変わるに対し分離したミオシン区ゲルを凍らした場合は，14 日後でも Z 字形を保つており，凍結の前後で曲線の傾向はたいして変わつていない。この原因としてまず考えられるのは，ミオシン区蛋白が肉中に存在するときと，分離されたゲルとして存在するときでは，環境や水和状態に著しいちがいがあることである。ミオシン区蛋白が肉中に存在するときは，肉の死後変化に基づく生化学的影響の下におかれている。従つて，その凍結中の変化は，凍結そのものによる影響と，肉の生化学的変化にもとづく影響が重なりあつて生じた結果と考え

られる。一方，分離されたミオシン区蛋白ゲルは，肉の生化学的変化の影響からは一応解放されているが，肉中に存在する場合にくらべきわめて高い水和の状態にある。この水和度の高いことは，凍結によつておこるミオシン区蛋白の変性に何か影響があろうと想像はできるが，これによつてミオシン区蛋白の溶存曲線に現われた上記の変化を説明することはむずかしい。検討を要する第二の点は試料の個体差の問題である。コイ肉蛋白は個体差が大きく，即殺区の溶存曲線は常にZ字形であり，苦悶死区のはだらだら形ときめるわけにはいかない。例えば今回の実験1は12月3日，実験3は12月4日に行つたもので，用いたコイは全く同じ季節，同じ群のほぼ同じ大きさのものであるが，実験1の苦悶死区の曲線はだらだら形，実験3ではZ字形を示している。したがつてミオシン区蛋白の溶解度曲線の大体の傾向の変化だけをとりあげても決して簡単に結論できないことがわかる。要するにミオシン区蛋白の塩析現象にみられた変化がどのような機作によつておこるのか，またその変化のうちどれが凍結による特有のものであるかについての結論は，なおいろいろの方面からくりかえし実験した結果にまたねばならない。

しかし，とにかく今回の実験で凍結2日から14日間にミオシン区蛋白に著しい変化のおきたことはたしかである。しかも溶出蛋白量には大差がみられなかつた。比較的短期間の凍結では，蛋白の溶出量に変化のおきないことは，−35°Cで凍らし，−20°Cに12日放置したBaltic herringの肉について行なつたNIKKILÄら[1]の実験でも明らかである。またSEAGRAN[4]がrock fishを−30°Cに凍結し，その温度に貯蔵した実験によると，抽出分離したアクトミオシンの固有粘度は最初の半日に1.70から1.17に，8日間に1.10まで下つているが，アクトミオシンの溶出量はこの間殆んど変わつていない。従つて，溶出量は蛋白の変性をみる目安として最も広く用いられており，また充分その理由があるが，少なくとも肉を短期間凍結した場合の変性をみる目安としては適当でないことがわかる。

塩析曲線にアクチン区分の出現

苦悶死したコイ肉の塩析曲線にアクチン区分の現われることは，さきにわれわれの見出した事実であるが凍結すると即殺肉にもアクチン区分の現われることが，今度の実験でわかつた。しかし，即殺肉を5°C附近に2日放置した場合にも同じような現象がみられる（未発表）。従つてこれは特に凍結によつてひきおこされた変化とは考えられない。苦悶死区の曲線にアクチン区分の現われるのは，われわれの考え[2]によると，苦悶死肉のATP含量が少ないことに関係がある。すなわち筋肉の死後変化の過程には，アクチンとミオシンとの結合を弱めるような要因が生ずるが，ATPにはこれを抑えるような効果があると想像される。従つて放置によつてATPが消費しつくされると，即殺区の塩析曲線にもアクチン区分が現われてくる。死後変化は凍結中にも徐々にすすみ，今回の例では凍結2日の試料中には$\Delta 7P$-P全くなく，この点に関する限り即殺区の肉も苦悶死区の肉と同じような状態になり，塩析曲線にアクチン区分が現われたものと考えられる。

一方，即殺肉から分離したミオシン区蛋白ゲルを凍結した場合には，アクチン区分が認められない（実験2, Fig. 4)。これは，アクチン出現の理由に関するわれわれの説によれば，つぎのように説明することができる。すなわち，ミオシン区蛋白を分離する操作の間に筋肉中のエキス分が除かれてしまうため，アクチンとミオシンの結合をよわめ，塩析曲線にアクチン区分を出現させる主原因となつている要因が生じないためと考えられる。従つて実験2の結果は，アクチン出現についてのわれわれの説を間接に支持するものといえよう。同様に，凍結1日の苦悶死肉にみられたアクチン区分が，ATPの添加によつて消失したこと（実験6）は，われわれの説によれば，当然期待しうるところである。ところが凍結2日，6日の試料では，ATPの添加にかかわらず，アクチン区分が残つているような結果がえられている。この理由は明らかでないが，おそらく死後変化に基づく筋肉蛋白の変性が時間の経過とともに強くなり，そのため，今更ATPを添加しても回復できぬほどアクチンとミオシンの結合力の低下が，すすんだためではないかと想像される。

塩濃度の増加によつておこる塩析量の減少

塩析分析のさい，硫安の濃度がますと，塩析される蛋白の量がかえつてへる区分がはつきりと認められるのは，凍結による変性と関係があるらしい。今まで凍結以外の場合にも同様な現象があるらしく見えたこと

もあつたが，あまりはつきりしたものでない場合が多い。

よく知られているように，塩類は低濃度では筋肉グロブリンの溶解度をまし（塩溶効果），高濃度では蛋白を溶液から析出させる（塩析効果）。EDSALL[5] がりん酸塩 buffer のイオン強度（$\Gamma/2$）と筋肉グロブリン（ミオシン区蛋白）の溶解度をしらべたところによると，塩溶作用は $\Gamma/2=0.25\sim0.3$ の間で急におこり，$\Gamma/2=0.5$ 近くで最大に達し，塩析効果は $\Gamma/2\doteqdot2.5\sim3$ において著しく認められる。今回の塩析分析では，ミオシン区蛋白を 0.5M KCl-りん酸塩 buffer（全イオン強度 0.8）にとかし，それに硫安を加えていつた。10% 飽和の硫安はだいたいイオン強度 1 であるから，塩析曲線において硫安の 10% 飽和と示されている系の全イオン強度は 1.8 になる。従つて硫安のごく低濃度の区域を除くと，塩析分析の行なわれた条件の下では，蛋白分子の水和は塩濃度がますにつれて減少していく状態にあると考えられる。従つて塩濃度がますにつれて，塩析される蛋白の量がましていくことは，たやすく予想できるところである。しかし凍結試料にみられたように，硫安の相当濃い濃度区分 $c_1\sim c_2$ の間で，塩濃度がますとかえつて塩析される量がへることは，c_1 で塩析された蛋白のあるものが，特殊な性状をもつていたと考えなければ説明できない。例えば，(1) c_1 で塩析された蛋白のあるものは，塩濃度が c_1 よりますとより溶けやすい成分に解離し，塩濃度が c_2 になると，この成分が塩析されると考えるか，(2) もしこのような解離がおこらないとすれば，蛋白の溶解性に支配的影響をおよぼす分子の水和と荷電が何か特別な状態にあるのではないかと考えられる。(2) の場合には，c_1 で塩析された蛋白のあるものは，水和がかなり大きく，塩濃度 $c_1\sim c_2$ の間では塩濃度の増加によつて脱水的影響を受けても，もし電気的に各蛋白分子が反撥することができるなら，なお蛋白分子を溶解状態に保つに充分に水和をもつと仮定すれば，これが c_1 で塩析されたのも，$c_1\sim c_2$ の間では溶けたままでいられたのも，主に荷電の問題として一応次のように説明できるだろう。すなわち c_1 で塩析されたのは，第 2 次層* に吸着された塩の正負両イオンが釣合いを保つているため，蛋白分子相互に斥力がはたらなかつた結果であり，塩濃度が c_1 から c_2 にます間で溶存状態に保たれていたのは，第 2 次層に新たに塩の両イオンが加わるとともに正負の釣り合いが崩れて，蛋白分子を互いに反撥させる程度の電荷が生じたためではないだろうか。しかしこの二つの考えは，現在のところあくまでも一応の説明であつて，その当否は，c_1 で析出した蛋白のなかに $c_1\sim c_2$ の間で解離するものが実際あるか否か，または水和および荷電の状態の特異なものがあるか否かの実験的証明によつてきまるものであることは，いうまでもない。またなぜ肉を凍結することによつて c_1 の硫安濃度で塩析される蛋白の性状がこのように変わるのか，またなぜ分離したミオシン区蛋白ゲルを凍らした場合には $c_1\sim c_2$ の間で塩析される蛋白の減少が肉を凍らした場合よりも少ないかについては今のところ何もいえない。

摘　　要

1　コイ肉を −15°C で凍結し，その温度に貯蔵すると，2 日，6 日で，ミオシン区蛋白は，硫安に対する溶存曲線や塩析曲線に著しい変化を示しはじめるが，塩溶液に対する溶出度は殆んど変らない。

2　ミオシン区蛋白の硫安に対する溶存曲線や塩析曲線からみると，凍結によつて，即殺肉は凍結前の苦悶死肉に，苦悶死肉は凍結前の即殺肉に近づくような結果がえられた。ただしこれが凍結によるミオシン区蛋白の変性の特徴であるか否かは明らかでない。

3　肉として凍らしたときと，分離したゲルとして凍らしたときとで，ミオシン区蛋白のうける変化は必らずしも同じではない。

---

* 塩溶液中で蛋白分子は反対イオンを吸着して，その固有の電荷を中和し，分子間の斥力を失なうが，塩濃度が蛋白のもつている固有の電荷を中和させる以上（ミオシンの場合 KCl の濃度 0.025M）になると，塩の正負両イオンが第 2 次層に当量吸着される。この場合は当量の正負イオンが吸着されるのであるから，蛋白分子はさしひき電荷をもたぬはずであるが，実際には第 2 次層に吸着された正負両イオンは辛うじて釣り合いを保つている状態で，塩の種類によつて正負いずれかのイオンが優勢となり，蛋白分子は新たにごくよわいながら電荷をおび，それに応じて再び分子間斥力がはたらく場合もある[6]。

4　凍結試料のミオシン区蛋白は，硫安のある濃度区域では，塩濃度がますとかえつて塩析されがたくなる。これは，肉として凍らしても，ゲルとして凍らしてもみられる現象であるが，後の場合にはやや程度がよわい。

5　即殺肉も凍結すると，そのミオシン区蛋白の塩析曲線にアクチン区分が現われる。しかし即殺肉から分離したゲルを凍らした場合にはみられない。またこのアクチン区分は，凍結1日の苦悶死肉の場合，ATPを添加して抽出したミオシン区蛋白には現われない。しかし，このATPの効果は，凍結2日以上の試料についてはみられない。

文　　献

1) NIKKILÄ, O. E., LINKO, R. R.: *Food Research*, **19**, 200 (1959).
2) 右田正男・大竹茂夫: 本誌, **26**, 140 (1960).
3) SNELLMAN, O., TENOW, W.: *Biochem. et Biophys. Acta*, **13**, 199 (1954).
4) SEAGRAN, P. L.: *Food Research*, **21**, 505 (1956).
5) EDSALL, J. T.: *J. Biol. Chem.*, **89**, 289 (1930).
6) SZENT-GYÖRGYI, A.: "Nature of life—A study of muscle—", Acad. Press. Inc., Publishers (1948).

致死条件が魚肉蛋白におよぼす影響—III.

ミオシン区蛋白の粘度にみられる相異

右田正男・鈴木たね子

日本水産学会誌
第二十七巻 第八号 別冊
昭和三十六年八月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 27, No. 8, August 1961

致死条件が魚肉蛋白におよぼす影響 - III.
ミオシン区蛋白の粘度にみられる相異

右田正男・鈴木たね子

(1961 年 3 月 20 日受理)

INFLUENCE OF DIFFERENT LETHAL CONDITIONS UPON FISH MUSCLE PROTEINS—III.
VARIATION IN VISCOSITY OF MYOSINS EXTRACTED FROM FISHES KILLED IN DIFFERENT WAYS.

Masao Migita and Taneko Suzuki*

Previously it was suggested from salting-out analysis that intermolecular interaction between actin and myosin might be weaker in myosins (= muscle proteins which are extractable with 0.6M KCl and precipitate on dilution) from carp killed after struggle than in those from carp put to an instant death. Variation in mutual reactivity of actin and myosin would necessarily have any influence on shape of myosins particles. Thus in the present work, viscosity was examined, expecting to obtain some knowledge about the variation in particle shape of fish myosins as a reflection of difference in lethal conditions.

Material and Method As test animals carp, red sea bream, and flatfish (for scientific names, see Table 2) were used. With each species, two methods of killing fish have been compared in respect of their effect on the viscosity behavior of extracted myosins: a group of fish was put to an instant death by beheading, and the other was allowed for several hours in air and then beheaded. Red sea bream died 30 min. after it was taken from water.

Viscosity was measured under varying concentrations (c) and mean velocity gradients ($\bar{\beta}$), and η_{sp}/c (η_{sp}: specific viscosity) were plotted against $\bar{\beta}+kc$, k being an arbitary constant and here put to 1000. From viscosity patterns thus obtained (Figs. 1~3), intrinsic viscosity $[\eta] = (\eta_{sp}/c)^{c\to 0}_{\beta\to 0}$ was determined and relations between η_{sp}/c and $\bar{\beta}$ as well as between η_{sp}/c and c were examined for each sample. In viscosity patterns (Figs. 1~3), slopes of lines parallel to XZ denote velocity gradient dependence of η_{sp}/c at respective concentrations, and slopes of lines parallel to XY denote concentration dependence at respective velocity gradients.

Results

1. As seen in Table 1, values of $[\eta]$ fell roughly between 2 and 3 for all tested species of fish. No significant difference in $[\eta]$ was observed between instant death group and death-after-struggle group with the same species. Therefore, the same would be true with avarage particle asymmetry in a resting solution at infinite dilution.

2. Velocity gradient dependence of η_{sp}/c which is a function of both asymmetry and length of particle, was obviously greater in instant death group than in the other with each species, as seen from slopes of XZ curves in Figs. 1~3. This might lead to conclusion that whether myosins particles are rigid or not, average length of molecules of myosins should be greater in instant death group, at least in the field of flow.

3. Effect of concentration upon η_{sp}/c varied considerably with species of fish, as seen from slopes of XY curves in Figs. 1~3. The effect was marked in carp (Fig. 1) and flatfish

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab.).

東海区水産研究所業績 B-354

(Fig. 3), being slightly greater in the former. Difference was hardly observed with these fishes between instant death and death-after-struggle groups. In these respects red sea bream (Fig. 2) proved to be unique. Thus, in instant death group, concentration effect was so small as η_{sp}/c seemed nearly constant independent of c. In death-after-struggle group the effect of concentration was appreciable, but obviously smaller compared with that in carp or flatfish. As concentration effect is considered due to mutual interference of solute particles, the effect might be a function of accessible active groups on the particles as well as asymmetry and length of solute particles.

4. Relations of η_{sp}/c and of $(\ln \eta_r)/c$ both at $\bar{\beta}=100$ sec, to concentration were examined with solutions of myosins from various fishes killed instantly (Fig. 4 and 5). The results were summarized in Table 2. Red sea bream myosins were unique in respect of that their viscosity increment varied little with concentration of the solution. In dab myosins $(\ln \eta_r)/c$ was independent of concentration as knwon to be the case with rabbit myosins. Squid myosins were peculiar in respect that both η_{sp}/c and $(\ln \eta_r)/c$ took a minimum value at a certain concentration. A similar case has been observed previously by the present authors with a solution of myosins from carp in summer which was left stand after preparation for several hours.

魚の致死条件が肉蛋白におよぼす影響について，石田，大竹[1]は，塩析分析の結果，コイ-ミオシン区蛋白は即殺，苦悶死両区ともにアクトミオシンとミオシンとからなると推定されるが，苦悶死区にはそのほかアクチン区分が現われることを明らかにし，苦悶死区のアクトミオンでは，アクチンとミオシンの相互作用が比較的よわいのではないかと考えた。もしそうならミオシン区蛋白の粘度に変化のあることが予想される。一方，粘度の変化は蛋白粒子の形および大きさの変化をあらわす有力な尺度の一つである。そこでわれわれはコイおよびその他の白身の魚について，即殺，苦悶死による肉質の相異を，ミオシン区蛋白の粘度の相異によつて明らかにしようと試みた。そのため粘度測定は前報[2]において検討した方法に従い，濃度 c および速度勾配 $\bar{\beta}$ を 0 に外挿し，固有粘度 $[\eta]$ $(\eta_{sp}/c)_{\substack{c\to 0\\ \beta\to 0}}$ (η_{sp}: 比粘度) を求めるとともに，$\eta_{sp}/c\sim\bar{\beta}$, $\eta_{sp}/c\sim c$ の関係をしらべることによつて，即殺および苦悶死魚から得られるミオシン区蛋白粒子の形状についておおよその知識を得ることを期待した。

試料および実験方法

試料‥‥コイ，マダイ，ヒラメなどを用い，水から揚げ直ちに頭をおとして殺したものを即殺とし，水から揚げ空気中に放置後同様に処理したものを苦悶死とした。(コイ，ヒラメは約1時間放置後処理したが，マダイは約 30 分放置後死んだ。)

ミオシン区蛋白の抽出*‥‥背部の肉 30g をとり，300 ml の KCl-燐酸塩 buffer (A 液‥‥0.5M KCl に KH_2PO_4 を 0.1M になるよう溶かす。B 液‥‥0.5M KCl に K_2HPO_4 を 0.1M になるよう溶解。A, B を合わせ pH 6.9 に調整，I 0.8) とともにブレンダーにかけ2分間抽出し，遠心分離した上澄を氷冷水で I=0.05 になるまで稀釈し，ふたたび遠心分離して沈澱を集め，これをミオシン区蛋白とした。

粘度の測定‥‥沈澱を KCl-燐酸塩 buffer に溶かし，適当な蛋白濃度の溶液 4~5 種を作り，直ちに傾斜型粘度計を用い 20°C で測定，流下時間の比から相対粘度 η_r を，η_r から $\eta_{sp}(=\eta_r-1)$ を，また KROEPELIN の式 (1) から，

$$\bar{\beta}=8V/(3\pi R^3 t_s) \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

* 前報[2]までは 0.6M KCl を用いて抽出を行なつたが，稀釈沈澱によりえられるミオシン区蛋白の量が抽出液の pH によつて違つてくるので，一定 pH で抽出する方法にかえた。なおミオシン区蛋白の稀釈沈澱を行なう場合，前報までは I 0.2 としたが，その後の検討の結果 I 0.2 でも 0.05 でも沈澱量にも，成分 (塩析分析による) にも変化がないことが明らかになり，特に I=0.2 を採用する積極的意味がなくなつたので，従来の文献にあるように I 0.05 を用いることにした。ただし，コイの例だけいままでの実験との比較もあるので 0.6M KCl で抽出し，I=0.2 で沈澱させた。

平均速度勾配をとった。また η_r 中の $\bar{\beta}$ を算出する式は前2報に述べるものとほぼ同じであるが，それは次のような理由による。

η_r の算出については前報では η_r を求めるに非ニュートン流体であるための補正項をおくべきで

$$\eta_r = \frac{4t_0}{3t_s + \dfrac{t_0}{t_s^2}\cdot\dfrac{dt_s}{dt_0}} \quad \left(\text{ただし，ごくうすい溶液では } \frac{dt_s}{dt_0} \fallingdotseq 1\right)$$

を用いながら，一方，平均速度勾配については，うすい溶液ではニュートン流体に対する式が近似的にあてはまるものと仮定して取扱つた。この仮定は非ニュートン流体の平均速度勾配をあらわすに最適当されているところであり，特に厳密な定量的論議を意図しない場合，例えば本論文におけるような場合には，許されるところである。しかし平均速度勾配について，このような仮定が成りたつような場合には η_r も理論上ニュートン流体におけると同じく，t_s/t_0 の比（ただし，t_s, t_0 はそれぞれ溶液および溶媒の流下時間）として簡単に求めることができる。したがつて $\bar{\beta}$ をニュートン流体についての式から求める以上，η_r についても同様処理してさしつかえない。実際計算の結果は，前報の方法によるものよりも約 10% 低い値がえられた。

前報では平均速度勾配を出すのに $\beta = 4V/(\pi R^3 t_s)$ なる式を用いたが，これは誤りで，この式は半径 R なる毛管壁における最大速度勾配を示すものであつて，平均速度勾配 $\bar{\beta}$ は，KROEPELIN の式から求められるべきである。従つて前2報に，平均速度勾配としてあげた数字は，過大であり，真の値はその 2/3 となる。ここに訂正する。

粘度図‥‥粘度測定の結果に分子論的解釈を与える一助として，前報にならい $\eta_{sp}/c \sim c$ (c 濃度) および $\eta_{sp}/c \sim \bar{\beta}$ の関係を見やすくするために，便宜上統軸に η_{sp}/c を横軸に $\bar{\beta} \times kc$ をとつて粘度図を作る。k は任意の定数であり，この作図の目的とするところからいつて，図を見やすくするには，おおよその場合は $k = 1000$ くらいにとるのが適当である。η_{sp}/c は c および $\bar{\beta}$ の函数であるが，$\bar{\beta} = \text{const}$ の曲線群（XY 曲線群とよぶ）については，各曲線の傾きはそれぞれの $\bar{\beta}$ においての $\dfrac{\partial \eta_{sp}/c}{\partial c}$ の $1/k$ の値を示し，$c = \text{const}$ の曲線群（XZ 曲線とよぶ）では各曲線の傾きはそれぞれの c においての $\dfrac{\partial \eta_{sp}/c}{\partial \bar{\beta}}$ の値そのものを表わす

実 験 結 果

1. 即殺および苦悶死コイのミオシン区蛋白の粘度

さきにコイミオシン区蛋白は夏と夏以外では，その粘度的性質が異なるのではないかと思われる事実が観察された[2]ので，夏および夏以外のコイにつき，即殺区3例（5, 7, 10 の各月），苦悶死区3例（2, 7, 10 の各月）をとり，そのミオシン区蛋白の粘度を測定し，それぞれ粘度図を作り，季節と致死条件によつて，それがどうちがうかをみた。各月の粘度図はだいたい同じような傾向を示しているので，ここには7月のコイについての結果を一例として Fig. 1-a, b に示す。図において横に走る曲線群は各濃度における粘度の $\bar{\beta}$ 依存性を，縦に走る曲線群は，各 $\bar{\beta}$ における粘度の濃度依存性をあらわしている。曲線 XZ は濃度の影響が無視できる場合における粘度の $\bar{\beta}$ 依存性を，曲線 XY は $\bar{\beta}$ の影響が無視できる場合における粘度の濃度依存性を示しており，XY（または XZ）が縦軸を切る長さ OX は，固有粘度 $[\eta] = (\eta_{sp}/c)_{\substack{c\to 0 \\ \bar{\beta}\to 0}}$ をあらわす。即殺区，苦悶死区各3例についての結果を綜合すると，$[\eta]$ の値（Table 1）と粘度の濃度依存性（XY 曲線の傾き）には，致死条件によるよりはほとんどみられず，季節的に 10 月のコイにやや特異性があるようにみえる。すなわち，即殺，苦悶死いずれも $[\eta]$ の値はやや低く，XY 曲線の傾きはやや大きい。しかるに各濃度における粘度の β 依存性を示す曲線の傾斜は，各月の例とも両区の間で明らかにちがつている。ほぼ同じ濃度におけるこの曲線の傾斜は即殺区では苦悶死区にくらべて大きく，濃度が無限に低くなつても（すなわち XZ 曲線）なお下降を示しているが，苦悶死区では濃度がある程度以下になると曲線は水平となる。すなわち，粘度の $\bar{\beta}$ 依存性は即殺区においては苦悶死区にくらべると大きく，充分低い濃度においてもなお認められるが，苦悶死区においては有限のある濃度以下では失なわれる。

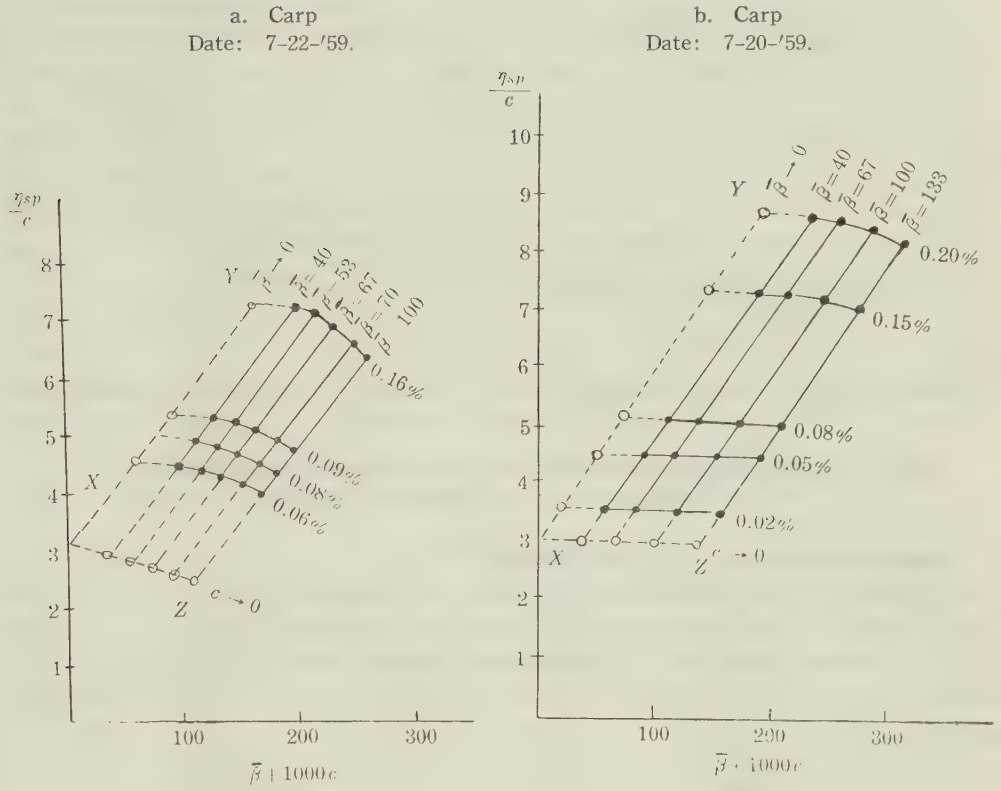


Fig. 1. Viscosity patterns of myosins from carp killed in different ways.
a. Instant death, b. Death after struggle.

Table 1. Intrinsic viscosity $[\eta]$ for myosins from carp, red sea bream and flatfish.

Lethal conditions	Carp			Red sea bream		Flatfish
	May.	Oct.	July	June	July	Feb.
Killed instantly	3.0	2.6	3.1	2.8	2.8	2.1
Killed after struggle	3.0	2.8	3.0	2.9	2.9	2.3

2. 即殺および苦悶死マダイのミオシン区蛋白の粘度

Fig. 2-a は即殺区，b は苦悶死区のマダイから抽出したミオシン区蛋白の粘度図である。両者を比較して一見気がつく非常に大きな相異は，粘度の濃度依存性を示す曲線群（XY 曲線群）のかたむきである。すなわち，即殺区の XY 曲線群はいずれもねており，その極端なものはほとんど水平に近くなつているが，苦悶死区では比較的たつている。このように致死条件によつて粘度の濃度依存性に大きいちがいのあることは，コイの場合と著しくちがうところである。一方，粘度の $\bar{\beta}$ 依存性はコイの場合と同じく，即殺区では XZ 曲線が $\bar{\beta}$ の増大につれて下降し，無限稀釈においても $\bar{\beta}$ 依存の存在を示すが，苦悶死区ではある濃度以下になると曲線が水平になり，粘度の $\bar{\beta}$ 依存性がなくなることを示している。ほぼ同濃度のところで粘度の $\bar{\beta}$ 依存性を比較すると即殺区のほうが苦悶死区よりも強い。固有粘度は即殺，苦悶死両区の間に全く差がない (Table 1)。つづいて行なつた他の一例でも全く同様な結果が得られた。

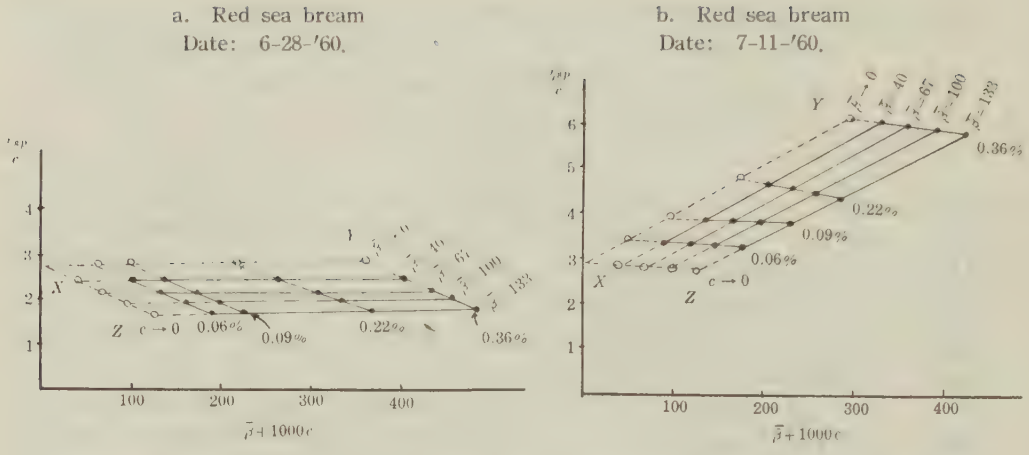


Fig. 2. Viscosity patterns of myosins from red sea bream killed in different ways.
a. Instant death, b. Death after struggle.

3. 即殺および苦悶死ヒラメ-ミオシン区蛋白の粘度

Fig. 3-a, b はそれぞれ即殺および苦悶死したヒラメのミオシン区蛋白の粘度図である。タイの場合にみられたような即殺区の XY 曲線群の水平に近い傾きはみられず，粘度の濃度依存性はだいたいコイの場合と似ている。粘度の速度勾配依存性については即殺区のものが苦悶死区のものよりも強いことは，コイやタイの場合と同じである。固有粘度 (Table 1) は即殺，苦悶死両区ともコイやタイの場合よりもやや低く，両区の間にはほとんど差がない。

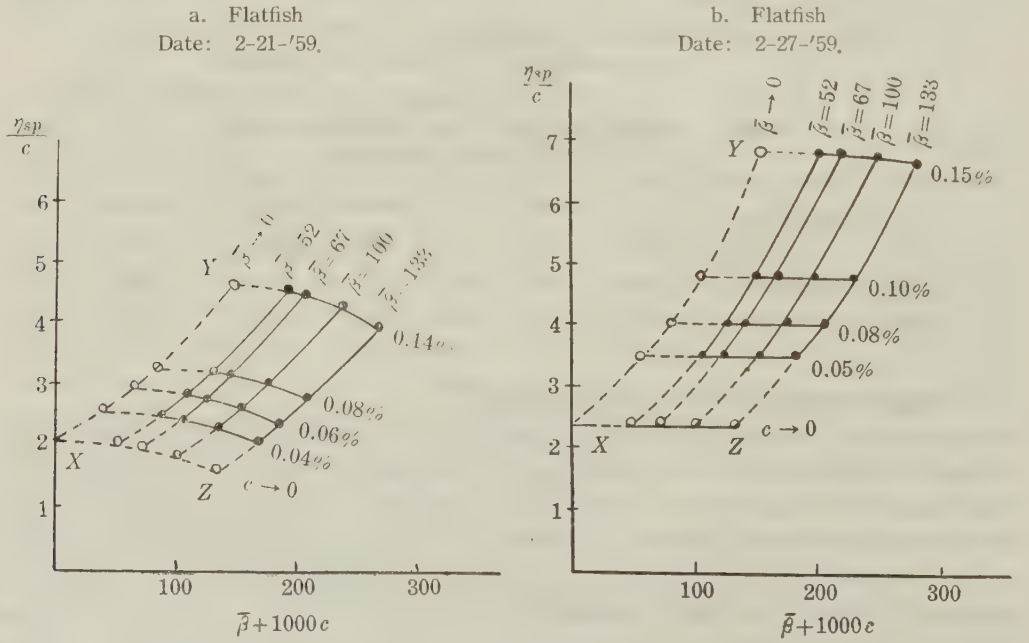


Fig. 3. Viscosity patterns of myosins from flatfish (*Paralichtys olivaceus*) killed in different ways.
a. Instant death, b. Death after struggle.

4. 粘度の濃度依存性

即殺区のタイでは粘度図の XY 曲線群が水平に傾き，実験の濃度範囲では，還元粘度 η_{sp}/c がほとんど濃度に関係のないことがわかつた。このような現象はコイやヒラメでは見られなかつたところであるが，ウサギ-アクトミオシンでは粘度数 $(\ln \eta_r)/c$ の値が濃度に関係のないことが知られている[3),4),5)]。η_{sp}/c なり $(\ln \eta_r)/c$ が c に関せず一定ということは，そのこと自体に対する興味のほか，固有粘度を求めるにあたつて $c \to 0$ に外挿する手間が省けるという利点もある。そこでカレイ（2例），ヒラメ (Fig. 3 の試料とは，季節の異なるもの)，セイゴ（2例），ハゼ等の白身の魚およびスルメイカ（4例）の即殺したものについて，$\eta_{sp}/c \sim c$，$(\ln \eta_r)/c \sim c$ の関係をしらべた。実験の都合上，粘度の測定は速度勾配をかえず $\bar{\beta}=100\,\mathrm{sec}^{-1}$ の下に行なつた。ただイカの場合は後述のような珍らしい現象がみられたので，cおよび $\bar{\beta}$ をいろいろにかえて測定し，粘度図を作つた。

Fig. 4 の a は 10 月のカレイ（1月のカレイについても同様の結果が得られた。）b は 12 月のヒラメ，c は 5 月のセイゴ（他の一例からも同様な結果がえられた），d は蓄養しておいた 3 月のハゼについての結果であつて，e は Fig. 2 のタイの粘度図から $\beta=100\,\mathrm{sec}^{-1}$ における $(\ln \eta_r)/c$ を計算したものである。

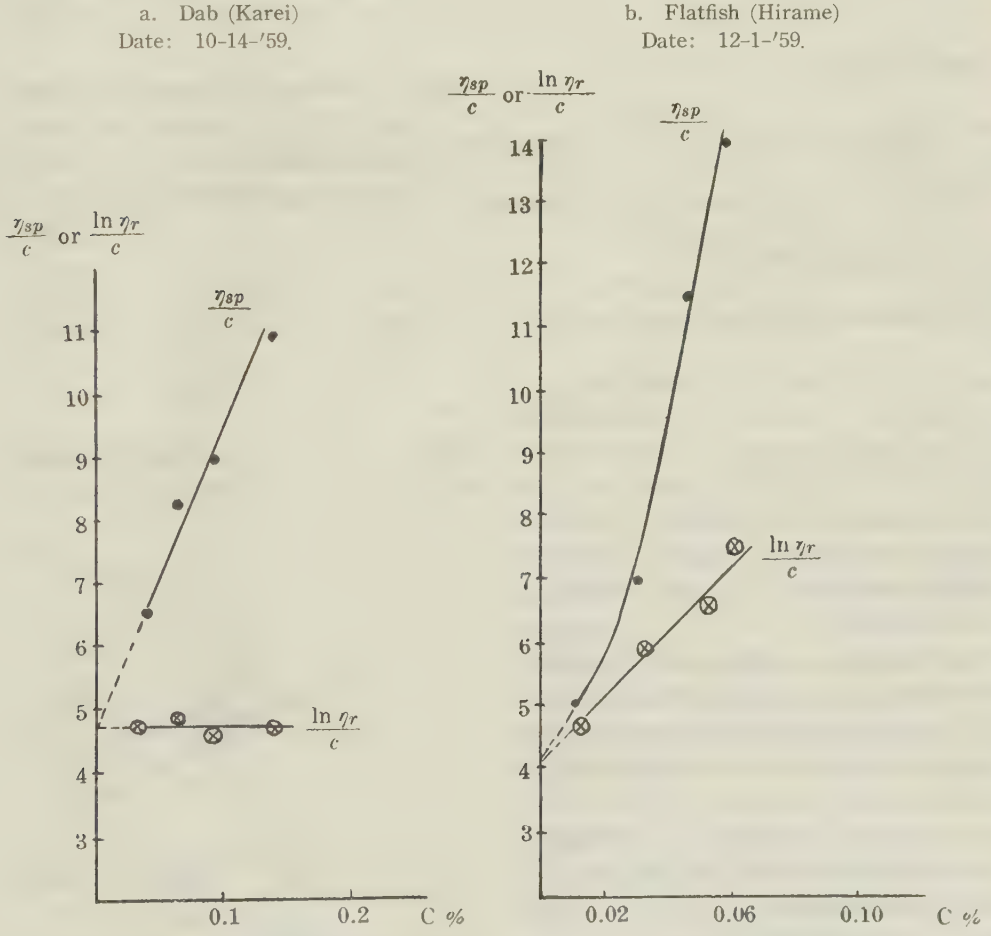
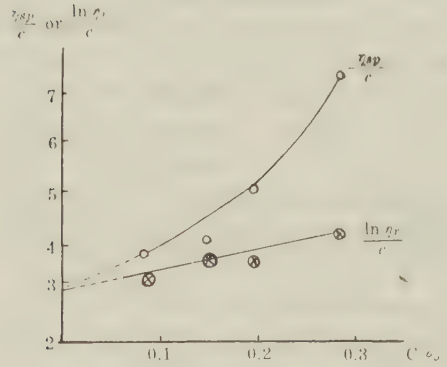


Fig. 4. Concentration dependence of η_{sp}/c and $(\ln \eta_r)/c$ for myosins from fishes killed instantly.
(Viscosity was determined at $\bar{\beta}=100\,\mathrm{sec}^{-1}$)

c. Common sea bass (young) (Seigo)
Date: 5-9-'60.



d. Goby (Haze)
Date: 3-7-'60.

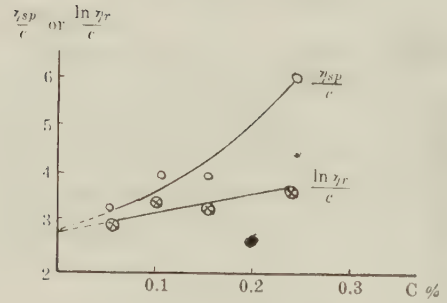
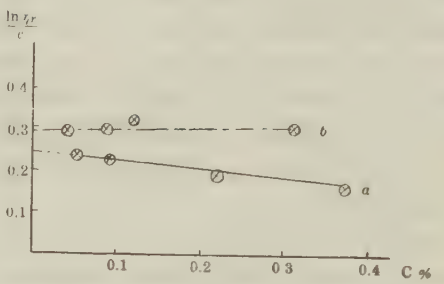


Fig. 5 は1月のイカについての粘度図である。イカについては，1月にさらに1回，6月に2回実験をくり返えし粘度図を求めたが，同様な結果がえられた。

Fig. 4, Fig. 5 およびコイ（前報[2]）の Fig. 3, 4 ならびに本報の Fig. 1), ウサギについての結果から粘度の濃度依存性をとりまとめると Table 2 のようになる。

表からわかるように，粘度の濃度依存性は動物によつて異なる。η_{sp}/c がほぼ c に関せず一定なのはタイのみで，その他のものはイカを除くといずれも c がますと η_{sp}/c は大きくなる。$(\ln \eta_r)/c$ が c に関せず一定なのは，カレイとウサギであつて，セイゴ，ハゼ，ヒラメ，コイでは c とともに直線的にふえている。タイでは c がますと $(\ln \eta_r)/c$ はかえつてへるような傾向がみえる。スルメイカはごく特異であつて，あまり濃度の大きくないところ（だいたい 0.15~0.10% の間）で，η_{sp}/c も，$(\ln \eta_r)/c$ も極小値をとる。これは前報[3]の夏季のコイのアクトミオシン溶液を放置したときにみた変化とおなじである。

e. Red sea bream (Madai)



a) Instant death (6-28-'60.)
b) Death after struggle (7-11-'60.)

Fig. 4. Concentration dependence of η_{sp}/c and $(\ln \eta_r)/c$ for myosins from fishes killed instantly.
(Viscosity was determined at $\bar{\beta}=100$)

Squid
Date: 6-1-'58.

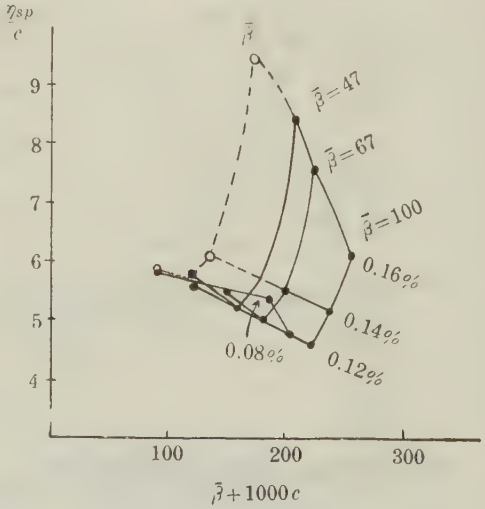


Fig. 5. Viscosity pattern of myosins from squid put to an instant death.

Table 2. Concentration dependence of viscosity of "myosins" from fishes and rabbit.

Name of animal	Scientific Name	Relation between η_{sp}/c and c	Relation between $(\ln \eta_r)/c$ and c
Red sea bream (Madali)	*Chrysophrys major*	η_{sp}/c is nearly constant independent of c	$(\ln \eta_r)/c$ decreases rectilinearly with increasing c
Dab (Magarei)	*Limanda herzensteini*	η_{sp}/c increases rectilinearly with c (Increase in η_{sp}/c is proportional to c)	$(\ln \eta_r)/c$ is constant independent of c
Common sea bass (young) (Seigo)	*Lateolabrax japonicus*	Increase in η_{sp}/c is greater than proportional to c	$(\ln \eta_r)/c$ increases rectilinearly with c
Goby (Haze)	*Acanthogobius flavimanus*	The same	The same
Flatfish (Hirame)	*Paratichthys olivaceus*	〃	〃
Carp (Koi)	*Cyprinus carpio*	〃	〃
Rabbit*		〃	$(\ln \eta_r)/c$ is constant independent of c
Common squid (Surume-ika)	*Ommastrephes sloani pacificus*	η_{sp}/c takes a minimum value at a certain concentration	$(\ln \eta_r)/c$ takes a minimum value at a certain concentration

* MOMMAERTS[4] (at $\bar{\beta} = 1500 \sim 2000\,\mathrm{sec}^{-1}$), PORTZEHL[5] (at $\bar{\beta} = 2000\mathrm{sec}^{-1}$), MIGITA and SUZUKI[3] (at $\bar{\beta} \to 0$)

なお，Fig. 4 からみかけの固有粘度 $(\eta_{sp}/c)^{c\to 0}_{\bar{\beta}=100}$ をみると，ハゼ，セイゴでは 2～3，カレイ 4～5，ヒラメ 4.1 となつている。ヒラメについての値は Fig. 3 の約 2.0 にくらべると非常に高く，試料による差が甚だしいようである。

考　　察

粘度の速度勾配依存性

Fig. 1～3 の結果にみられるように，それぞれの魚種に共通に，即殺区と苦悶死区との間で明らかにちがつている点は，粘度の $\bar{\beta}$ 依存性が即殺区は強く，苦悶死区では弱いことである。各々の c における粘度の $\bar{\beta}$ 依存性を比較しやすくするために Fig. 1～3 の XZ 曲線群の各々について次のような作図を行なつた。すなわち，Fig. 6 において曲線 xz を濃度 c における粘度の $\bar{\beta}$ 依存性を示す曲線とし，この曲線上の点 B_1 を濃度 c，平均速度勾配 $\bar{\beta}_1$，点 B_2 を濃度 c，平均速度勾配 $\bar{\beta}_2$ なる条件の下にえられた η_{sp}/c の値とする。ただし，$\bar{\beta}_1$ および $\bar{\beta}_2$ は，いろいろとかえた平均速度勾配のうち，それぞれ最小および最大のものであつて，今回の実験では $\bar{\beta}_1 = 33$ または $40\,\mathrm{sec}^{-1}$，$\bar{\beta}_2 = 133\,\mathrm{sec}^{-1}$ である。B_1 を通つて横軸に平行線を引き，B_2 よりこれに垂線をおろし交点を H とし，$B_2H/B_1H(=v/h)$ を曲線 xz の傾きをみる尺度とした。各 c における v/h を計算して $c \sim v/h$ を図示したもの

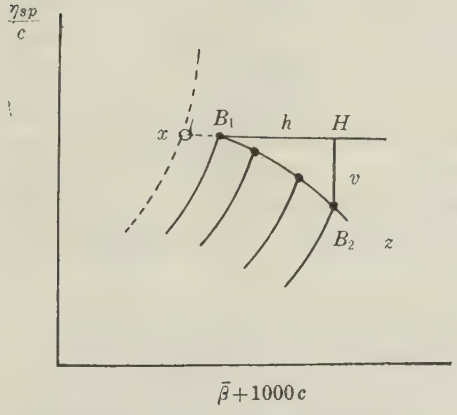


Fig. 6. A method showing effect of concentration on velocity gradient dependence of η_{sp}/c.

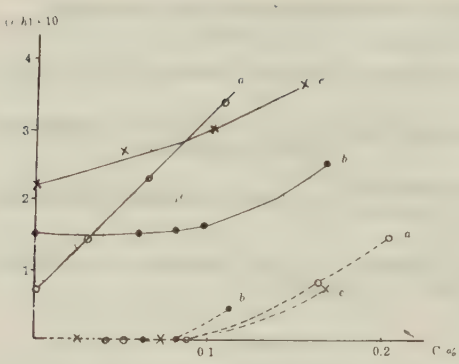


Fig. 7. Concentration effects on velocity gradient dependence of myosins from carp.
Solid lines (a, b, c)——Instant death group.
Broken lines (a', b', c')····Death after struggle group.
v/h: see Fig. 6.

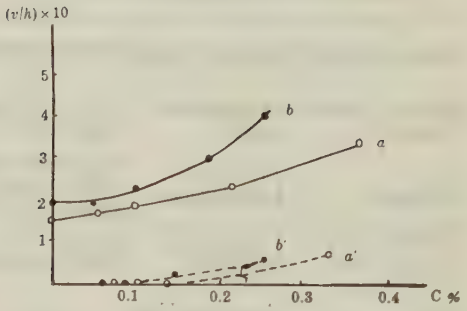


Fig. 8. Concentration effect on velocity gradient dependence of myosines from red sea bream.
Solid lines (a, b)—Instant death group
Broken lines (a', b')···Death after struggle group.

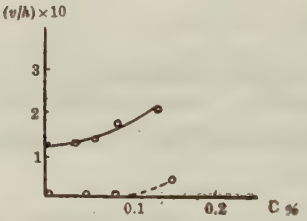


Fig. 9. Concentration effect on velocity gradient dependence of myosins from flatfish.
Solide line——Instant death group
Broken line····Death after struggle group.

が，コイについては Fig. 7，タイでは Fig. 8，ヒラメでは Fig. 9 である。図に明らかなように，いずれの試料においても即殺区に比して苦悶死区では粘度の $\bar{\beta}$ 依存性が弱く，前者が無限稀釈においてもなお $\bar{\beta}$ 依存性を示すのに，後者はある濃度（約 0.1%）になると，はじめて $\bar{\beta}$ 依存性がはっきりと現われてくる。速度勾配が大きくなると粘度が小さくなる現象は異常粘性とよばれ，その原因として，いろいろの場合が考えられているが，大ざっぱに分けると，(i) 流れの場で粒子が配向されるためにおこる orientation anomaly といわれる型と，(ii) 粒子が溶液中で作っている集合体が流れの応力によって次第にこわされるためにおこる elastic anomaly といわれている型とがある。前者はごくうすい溶液中でもおこるが，後者は粒子が作用しあって集合体を作りうるような濃度においてのみおこる[4]。線状の粒子は流れの場におかれると配向しようとするが，粒子の回転ブラウン運動はこれを妨げようとする。この両者のかねあいで，線状粒子のうすい系は，異常粘性を示す場合と示さぬ場合とがある。後の場合，濃度が少しますと異常粘性が現われることがある。これは濃度がますと粒子間の干渉のため回転ブラウン運動が妨げられ，粒子の配向のほうが優勢となるためであって，流れの場で粒子の集合体のこわれる (ii) の型とはちがう。MOMMAERTS[4] は，ウサギ-ミオシン（WEBER 液による 20 分抽出）溶液が 9 mg/ml 以上の濃度ではじめて異常粘性を示した事実をそのように説明している。われわれの場合，苦悶死区のミオシン区蛋白が，0.1% 以下の濃度では異常粘性を示さなかったのは，MOMMAERTS のウサギ-ミオシンの場合と同様に考えられる。

このように線状粒子のうすい系が，異常粘性を示すか否かは，粒子が充分配向されるか否かによってきまるが，粒子の配向されやすさは，粒子の非対称度の大きいほど，また粒子の長さが大きいほど著しい。

固有粘度 $[\eta]$ は，粒子が互いに干渉されず，またずりの応力もうけず，ただブラウン運動のみを行なっているという一つの極限の状態における粒子の非対称度を示す尺度となるものである。ところが，Table 1 にみられるように，今回用いた魚の $[\eta]$ は，どの魚種についても，即殺区と苦悶死区の間にほとんど差がない。したがって，各ミオシン区蛋白の極限状態における粒子の平均非対称度は，魚の致死条件によってちが

わないということができる。しかるに即殺区のミオシン区蛋白は，苦悶死のものよりも，強い異常粘性を示す。この事実に対しては次の2つの考え方がある。

（1） もしミオシン区蛋白粒子は rigid であつて，流れの場においても，極限の状態においても形が変わらないものとすれば，苦悶死区のミオシン区蛋白の粒子は，即殺区のものに比し，平均の軸比はおなじであるが，平均の長さが小さいものと考えられる。

（2） もし魚のミオシン区蛋白の粒子は rigid ではなく，流れの場におかれると，ずりの応力によつてひきのばされるものとすれば，即殺区と苦悶死区のミオシン区蛋白の粒子は，極限の状態では全く同じ形をしているが，流れの場におかれると，即殺区の粒子のほうが，苦悶死区の粒子よりも，ひきのばされ易い性質があると考えられる。ひきのばされると長さとともに軸比も変わり，その結果，β-依存性の強さに大きいちがいがでてくる。

MOMMAERTS[4] は，ウサギ-ミオシンの粘度から出した軸比は $\bar{\beta}$ によつて変わらないが，アクトミオシンの場合はかわることから，ミオシン粒子は rigid で，アクトミオシン粒子は elastic であるといつている。魚のミオシン区蛋白は，いろいろの事実から主としてアクトミオシンからなつているとされている。従つて即殺および苦悶死魚の場合は，上記 (2) の考えによつてよりよく説明できそうに思えるが，MOMMAERTS が軸比を出すに用いた式には，いろいろの仮定がふくまれているから，たしかなことは分子量を比較してみることであろう。

粘度の濃度依存性

XY 曲線の傾きは粘度の濃度依存性の大小を示すものであるが，Fig. 1~3 においてもつとも注目に値することは，他の魚の場合にくらべタイの XY 曲線が著しくねていることである。即殺区では特に著しいが苦悶死区でも明らかに同様な傾向が認められる。致死条件によるちがいもタイの場合は一番はつきりしており，2例とも苦悶死区の XY 曲線は即殺区のより明らかに立つている。

濃度依存性は，溶質粒子が互いに作用しあうために起ると考えられており，長い粒子の場合に特にはつきりと観察されている。そこで即殺タイのミオシン区蛋白の粘度の濃度依存性がきわめて低いのは，その粒子が特に短かいのではないかと一応考えられる。

しかし一方，長さのちがいだけでは説明し難い事実もある。すなわちタイの場合は，致死条件によつて粘度の濃度依存性がことなり，苦悶死区のほうが明らかに大きい。したがつて上にのべた考えによると，苦悶死タイのミオシン区蛋白の分子は，即殺区のものよりも，流れの場における平均の長さが大きいとしなければならない。ところが $\bar{\beta}$-依存性からみると前述のように，即殺区の分子のほうが苦悶死区のものよりも平均の長さが大きいとしなければならない。この不一致は，濃度依存性を支配するものは分子の非対称度や長さばかりでなく，それ以外にも重要な因子があるのではないかということを示唆するものであろう。濃度依存性のおこる原因は流れの場で粒子が互いにさまたげあつたり，からみあつたりするためであると考えると粒子の表面に存在する活性基の種類や量なども関係しているのではないだろうか。

イカ-ミオシン区蛋白の粘度

ある濃度で η_{sp} が極小値を示したイカは特異な例である。夏季のコイのミオシン区蛋白溶液を放置した場合にも同様の現象がみられた[2]。実験に用いたイカは，前述のように，市場で手に入れたものであるが，なお生きていたものである。η_{sp}/c の値がある濃度で極小となるということは，必らずしもその濃度以下で相対粘度 η_r が上昇するということではなく，前報コイの場合に証明したように，その濃度以下では $\eta_r \sim c$ の関係が凸型 (convex) 曲線になつているため，この濃度以下で，この関係が凹型 (concave) 曲線または直線であらわされるとした場合にくらべると，低濃度域における粘度が高くなつているのである。この原因の1つとしてイカ-ミオシン区蛋白では濃度がごく低くなると粒子のひろがりがますのではないかと想像されるが，これもまた今後の実証を要する問題である。

摘　　要

1. 致死条件のことなる魚から抽出したミオシン区蛋白の粒子の形がどうちがうかについて，おおよその知識をえたいと考え，即殺および苦悶死させたコイ，マダイ，ヒラメのミオシン区蛋白の粘度を，濃度 c と平均速度勾配 $\bar{\beta}$ をいろいろにかえて測定し，固有粘度 $[\eta]=(\eta_{sp}/c)_{\substack{c\to 0\\ \bar{\beta}\to 0}}$ および $\eta_{sp}/c\sim\bar{\beta}$, $\eta_{sp}/c\sim c$ の関係を求め，次のような結果をえた。

（i）$[\eta]$ は 2.1～3.1 の間にあり，魚種による差は小さいが，ヒラメではやや低いようであつた。同種の魚の即殺，苦悶死両区の間ではほとんど差がなかつた。したがつて粒子が溶液中でまつたく自由な状態にあるときの粒子の非対称度についても，同じことがいえる。

（ii）η_{sp}/c の $\bar{\beta}$ 依存性は，どの魚についても，即殺区のほうが苦悶死区よりも大きい。このことは，粒子を rigid なものと考えても，elastic なものと考えても，とにかく流れの場で，苦悶死区のミオシン区蛋白粒子は，即殺区のものよりも長さが小さいことを示す。

(iii) η_{sp}/c の濃度依存性は，コイもヒラメもかなり強いが，コイのほうがややつよい。致死条件によるちがいは，両者ともほとんどない。この点タイは特異であつて，即殺区では濃度依存性きわめて弱く，η_{sp}/c の値は濃度がかわつてもほとんど一定に近い。また苦悶死区のタイは，即殺タイにくらべると，濃度依存性が大きいが，コイ，ヒラメにくらべると明らかに小さい。

2. 即殺したコイ，タイ，ヒラメ，カレイ，セイゴ，ハゼ，イカについて，$\bar{\beta}=100\,\mathrm{sec}^{-1}$ における $\eta_{sp}/c\sim c$, $(\ln\eta_r)/c\sim c$ の関係をしらべた。η_{sp}/c が濃度によつてほとんど変わらないものは，タイのみであつて，カレイではウサギにおけると同じように，$(\ln\eta_r)/c$ が濃度に関せず一定であつた。イカではある濃度で η_{sp}/c も $(\ln\eta_r)/c$ も極小になるという結果がえられた。同様なことが前に夏季のコイのミオシン区蛋白溶液を放置した場合にも見られた。

粘度の算出についていろいろな御教示をたまわつた源生一太郎所長に厚く御礼申上げます。

文　　献

1) 右田正男・大竹茂夫: 本誌, **26**, 140 (1960).
2) 右田正男・鈴木たね子: 本誌, **25**, 127 (1959).
3) 右田正男・鈴木たね子: 本誌, **25**, 319 (1959).
4) MOMMAERTS, W. F. H. M.: *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.* **19**, 1～20 (1945).
5) PORTZEHL, H. et al.: *Z. Naturforsch.* **5 b**, 61 (1950).
6) SIMHA, R., COHN, E. J. and EDSALL, J. T.: "Proteins, aminoacids and peptides as ions and dipolar ions" p. 519 (1943).

魚の死後経過にともなうミオシン区蛋白の変性—I.

魚種および致死条件が溶出性, 塩析域, および粘度の変化におよぼす影響

鈴木たね子・右田正男

(1961 年 11 月 11 日受理)

POST-MORTEM CHANGE OF FISH MYOSINS—I
SOME PHYSICOCHEMICAL CHANGES WITH SPECIAL REFERENCE TO SPECIES AND LETHAL CONDITIONS OF FISH

Taneko Suzuki and Masao Migita*

Material and method As white muscle fish, carp, red sea-bream, goby were used, and yellow-tail and mackerel as red muscle fish. Fish were killed in two different ways: one group was put to instant death by beheading, and the other was left for several hours in air and then beheaded.

A portion of muscle was taken from each fish and subjected to experiments immediately after death, while other portions of muscle were taken after storing for 24 and 70~90 hrs. at ca. 3°C and used as samples in rigor and post-rigor, respectively.

Results

1. *Extractability.* Amount of the extracted myosins (obtained by blending with 0.6 M KCl for 2 min., followed by centrifugation, and diluting to $\mu=0.05$) was rather greater in rigor than pre-rigor or post-rigor, regardless of species or lethal conditions of fish (Fig. 1).

2. *Salting-out curves.* Salting-out curves suggested that actomyosin is dominant and almost the only component of myosin fraction from any of the sea fish used, at any post-mortem phase (Fig. 2~5). With red sea-bream and goby, no significant difference in salting-out pattern was observed between fish put to instant death and those killed after struggle (Figs. 2, 3). In some cases, small peaks were observed besides the major peak of actomyosin. But the reproducibility in such peaks was substantially less than that obtained for actomyosin peak.

It seems that there exist some distinct types in the salting-out curve ($S\sim C$ curve) according to species and conditions of fish. Most of the sea fish used, especially those killed instantly, gave a typical sharp drop as curve (a) in Fig. 13, while different types of curve were obtained from carp tested in different seasons (Fig. 13).

3. *Viscometric behaviors.* In white muscle fish which were put to instant death, intrinsic viscosity, $[\eta]^{c\to 0}_{\beta\to 0}$, of myosin fraction was found to increase in the following order with respect to the post mortem phase: pre-rigor < in rigor < post rigor (Figs. 6, 8). However, when the fish were killed after struggle, intrinsic viscosity remained almost unchanged in the course of time after death (Figs. 7, 9). Anomaly of viscosity (velocity gradient dependence of viscosity) decreased progressively with the course of post-mortem change, regardless of lethal conditions of fish.

In red muscle fish put to instant death, intrinsic viscosity decreased so far as to 0.5~0.2 after the muscle passed into rigor. Anomaly of viscosity was, in general, weaker compared with the case of white muscle fish, and was hardly appreciable after onset of rigor, within the concentration range tested (Figs. 10, 11).

東海区水産研究所業績 B 第 359 号

* 東海区水産研究所 Tokai Reg. Fish. Lab., Chuō-ku, Tokyo, Japan.

魚肉の死後変化については，従来生化学的あるいは鮮度化学的な見地からいろいろ研究されている。しかし魚肉加工の立場からみると，肉の主成分である肉蛋白質の死後における変性を知ることが，むしろ重要であると考えられる。

筋肉の死後変化は ATP の消費と密接な関係がある。一方，ATP は筋肉の主要蛋白であるミオシン系蛋白の性質に支配的な影響をおよぼす。したがつて，筋肉の死後変化にともない，ミオシン系蛋白になにか大きな変化のおこることは，想像にかたくない。しかしこの方面の研究については，主としてミオシン系蛋白の溶出性の変化が調べられているほかは案外少ない。しかも溶出性の変化は，蛋白の変性をみる一つの尺度ではあるが，それは，蛋白の変性にもとづく溶解度の変化のほか，筋肉組織の性状の変化にも大きく支配される。したがつて，それは一義的に蛋白の変性を示すものではない。蛋白の変性を明らかにするためには，溶出性の変化とともに，溶出してきた蛋白の性状の変化をしらべる必要がある。さらに，死後変化に伴なうミオシン系蛋白の変性を調べるにあたつては，動物の種類，生前の生理状態，致死条件をも考慮にいれる必要がある。なぜならば，これらの因子は，よく知られているように，死後の筋肉中の ATP の消長に影響を与えるからである。

そこで今回は，以上のことを考えに入れて，溶出量のほか，さきに致死条件によるコイ肉蛋白の性状のちがいを明らかにあらわした塩析曲線[1]，魚種および致死条件による肉蛋白の相異について示唆にとんだ結果のえられた粘度的性質[2]を尺度として，致死条件の異なる数種の魚の肉蛋白の死後変化をしらべた。魚種としては，保蔵，加工の面から，白身の魚と赤身の魚では，肉の性質に大きな相異のあることが知られているので，白身の魚としてコイ，タイ，ハゼ，赤身の魚としてイナダ，マサバを用いた。

実 験 方 法

(1) 実験材料

白身の魚‥‥コイ Carp. (*Cyprinus carpio*), マダイ Red sea bream (*Pagrosomus major*), ハゼ Goby (*Acanthogobius flavimanus*)。

赤身の魚‥‥イナダ Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), マサバ Mackerel (*Scomber japonicus*)。

いずれも生きているものを水から揚げ，直ちに，頭をおとして殺したものを即殺区とし，魚体を空気中に放置後，頭をおとして殺したものを苦悶死区とした。コイ，タイは生きているものを市場から購入し，ハゼは竿釣でとつたものを一定期間飼育して用い，イナダは水族館で飼育したもの，サバは漁獲後船上で，海水を送りながら生かしてきたものを，下船後直ちに処理した。

(2) 試料の保存方法

硬直前の実験は，魚の死後，ただちに脊部から肉をとり，蛋白の抽出を行なつた。残りの試料をポリエチレンシートに包み，3℃ 前後の冷蔵庫に保存し，24 時間後に硬直中の肉について，70～90 時間後に解硬した肉について同様の処理を行なつた。

(3) ミオシン区蛋白の抽出

肉に 10 倍量の KCl-りん酸塩 buffer (μ=0.8) を加え，ブレンダーによつて2分間抽出し，遠心分離した上澄液を氷冷水で $\mu = 0.05$ になるまで稀釈し，再び遠心分離して集め，これをミオシン区蛋白試料とした。ただし，ミオシン区蛋白の溶出量の測定には，0.6M KCl を用いて抽出を行なつた*。

(4) 蛋白濃度の測定

蛋白濃度の測定には，ビューレット法を用いたが，イナダ，サバのごとき魚種は，ビューレット試薬を加えると，発色液がわずかながら濁るので，キエルダール法を併用した。

(5) 塩析曲線

SNELLMAN および TENOW[3] の方法に準じ，ミオシン区蛋白を KCl-りん酸塩 buffer (0.1M K_2HPO_4/

---

* りん酸塩 buffer を用いて抽出を行なうとたまたまやわらかい沈澱を生ずることがあり，沈澱の分離の難易によつて，溶出量の測定に誤差を生じやすい。

0.5M KCl 1l + 0.1M KH_2PO_4/0.5M KCl 0.4l, pH 6.8) に溶かし，濃度の異なる一列の硫安溶液を加え，24 時間放置後，沪過し，沪液の波長 278mμ における吸光度 (S) を測定し，S-C (硫安濃度) 図を作り，図上 $-\Delta S/\Delta C$ を求め，硫安濃度に対し図示した。

(6) 粘度の測定

沈澱を KCl-りん酸塩 buffer に溶かし，適当な蛋白濃度の溶液 4～5 種を作り，直ちに傾斜型粘度計で測定を行ない，20℃ における流下時間の比から，相対粘度 (η_r) および，比粘度 (η_{sp}, η_r-1) を，KROEPLEIN の式から平均速度勾配 ($\bar{\beta}$) を求めた。$\eta_{sp}/c \sim c$, および $\eta_{sp}/c \sim \bar{\beta}$ の関係から粘度図を作製した。

実 験 結 果

I. 溶出量の変化

ミオシン区蛋白 (0.6M KCl, 2分，ブレンダー抽出，μ=0.05 でおとす) の溶出量は，Fig. 1 に示すように，実験の範囲では，魚種，致死条件に関せず，死後硬直中がその前後よりも，むしろ多い傾向がみられた。この結果は，斎藤・日高[4] がゴマサバについてえた，硬直の完了したころ溶出量が最小となり，その後いくぶんふえるが，再び漸減するという結果と，また獣肉についての多くの結果 (硬直に入ると溶出量は急激に減る。例えば，ウサギ: ERDÖS[5], BATE-SMITH, BENDALL[6]; ウシ: WIERBICK[7]) と異なる。しかし溶出量の値は，組織の破砕程度によりはなはだしく左右される。ここにあげた人々は，いずれもブレンダーを用いず，あらびきの肉を静かにかきまわして抽出している。この実験条件のちがいは，われわれの結果と異なる結果のえられた大きな原因となりうるように思える。上記の抽出方法を常法としている著者らの研究室では，魚肉の場合死後経過の比較的初期に，ミオシン区蛋白の溶出量の増加が，しばしば経験されている (例えば，コイ: 右田・松本[8]; ヒラメ: 右田・松本・鈴木[9])。

死直後および硬直期の ΔP-P の値 (肉 100 g 中 Pmg) は即殺タイ：22.4 (pre-rigor)，苦悶死タイ：14.6 (pre-rigos)，即殺ハゼ：10.8 (pre-rigor)，苦悶死ハゼ：7.7 (pre-rigor)，0 (In-rigor) であつた。

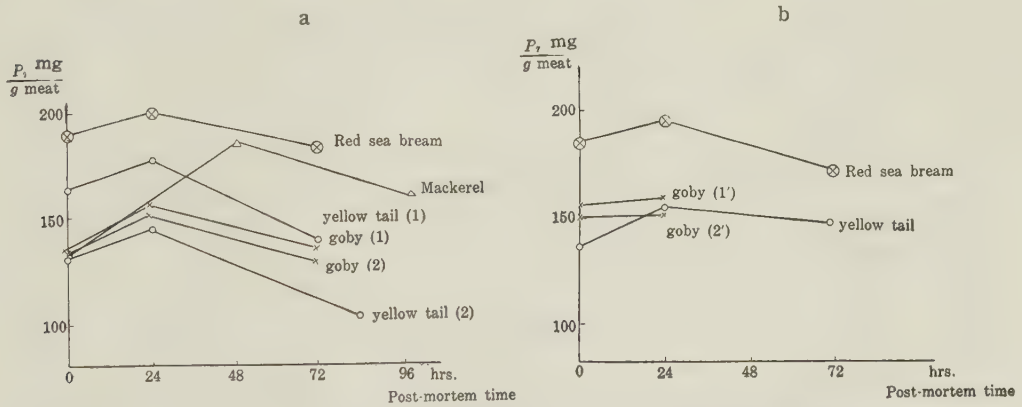


Fig. 1. Post-mortem changes of extractability of myosins from different fishes.
a.····Instant death b.····Death after struggle

II. 塩析曲線の変化

タイ (Fig. 2)，ハゼ (Fig. 3)，サバ (Fig. 4)，イナダ (Fig. 5) のいずれについても，致死条件，死後時間にかかわらず，硫安濃度 30～40 %飽和の間にはつきりした山があり，これがほとんど全体を支配している。しかし詳細にみると，この 30～40 %の山は，マダイではその頂点が硫安濃度 35 %以下に，ハゼでは 40 %近くに，イナダではほぼ 35 %のところにある。SNELLMAN ら[3]にしたがえば，ウサギの場合，硫安飽和濃度 28～32 %の山はアクトミオシン，35～40 %の山はミオシンと区別推定されるものである。しか

し，該当する塩析濃度の値そのものは人によつて必らずしも同一でない。例えばウサギ-アクトミオシンおよびミオシンについて，DUBUISSON[10] はそれぞれ 23～27 % および 35～39 %； 安井ら[11] は 30～38 %，および 38～41% をあげている。また，著者ら[12] は前に，ウサギのミオシン区蛋白について，32～38 % および 40～45% にはつきりした二つの山を認めた。この相異は主として実験条件と個人的な誤差（後述）によるものと考え，今回は一応 30～40% の山はアクトミオシン，40～45% の山はミオシンとみなした。もし 35～40% のあたりの山をミオシンとすると，ハゼでは中性の buffer を用い，ブレンダー抽出を行なつたにもかかわらず，そのミオシン区蛋白は塩析曲線にアクトミオシンの山を示さぬことになり，これはブレンダー抽出を行なうと，アクチンもミオシンも抽出され（溶液中でアクトミオシンを生ずる）るという HASSELBACH ら[13] のミオシン系蛋白の抽出に関する定説や，上田・志水・清水[14]が，マアジ，カワハギについてえた塩析分析の結果と一致しない。ことに抽出液が強い流動複屈折と高い粘度（$[\eta_{sp}/c]_{\substack{c\to 0\\ \bar{p}=100}} \fallingdotseq 2.8$）を示すことは，ハゼの 35～40% の山が，アクトミオシンであることの有力な証拠である。

タイ，ハゼでは，アクトミオシン，ミオシンの山のほかに，一般に硬直前にくらべると，硬直中，解硬後には，小さい不明の山が現われている。そのうち 50～60% あたりの山は，SNELLMAN ら[8]によると，トロポミオシンであるといわれるが，ハゼでは，苦悶死区にこの山がかなりはつきりと現われている（コイでも苦悶死区にこの区分が認められた[1]）。また即殺区でも，硬直期にはこの区分に小さい山がみられる。しかしアクトミオシンの大きな山以外の小さい山については再現性がきわめて低い。

イナダおよびサバでは，硬直の前・中・後を通じてほとんどアクトミオシンだけが顕著に現われている。ただサバでは，硬直中に明らかにミオシンと推定される山が認められるが，実験例が少ないので確定的なことはいえない。

右田・大竹[1] は，苦悶死コイのミオシン区蛋白では，塩析図にアクチンの山が顕著にあらわれることを明

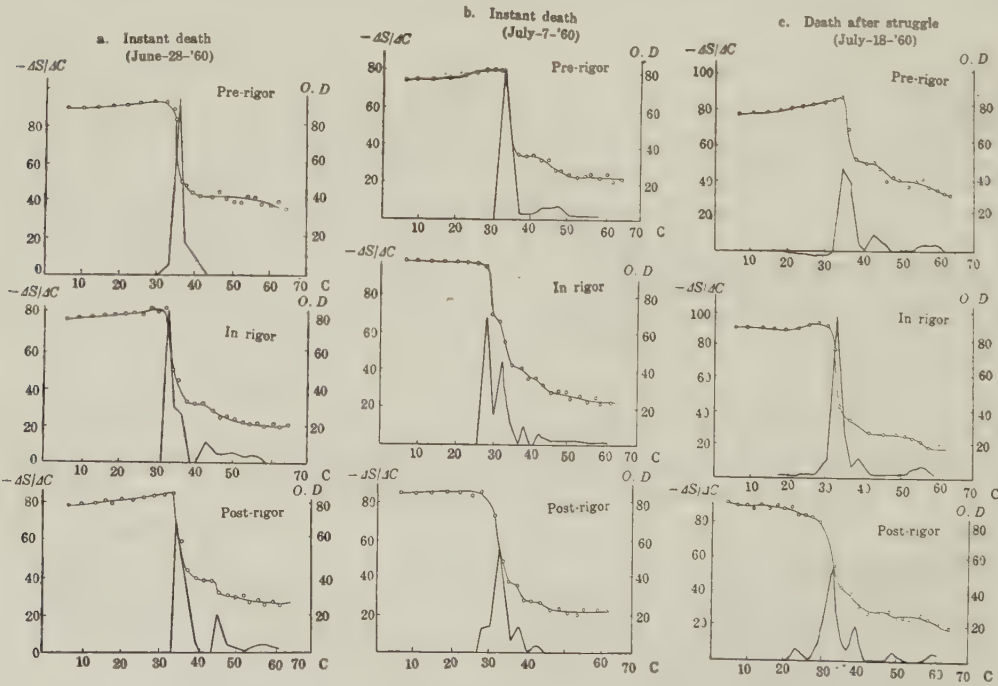


Fig. 2. Post-mortem changes of salting-out curves in red sea-bream myosins.
C: Saturation of ammonium sulfate (%)

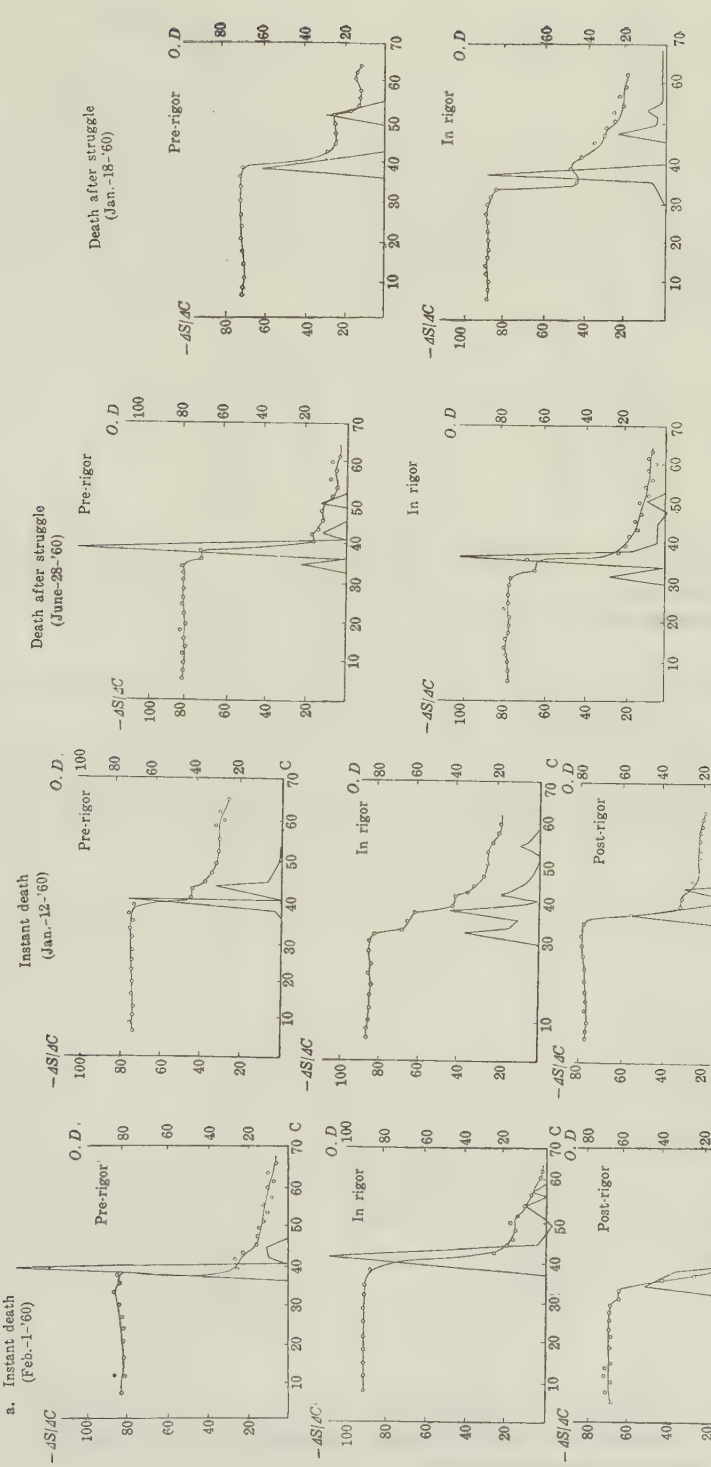


Fig. 3. Post-mortem changes of salting-out curves in goby myosins.

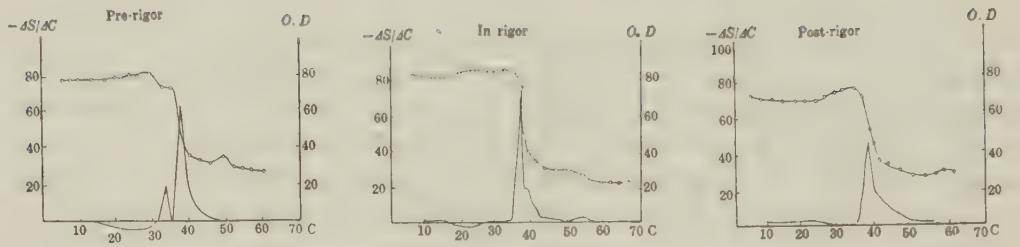


Fig. 4. Post-mortem changes of salting-out curves in yellow tail myosins. (Oct.-27-'70)

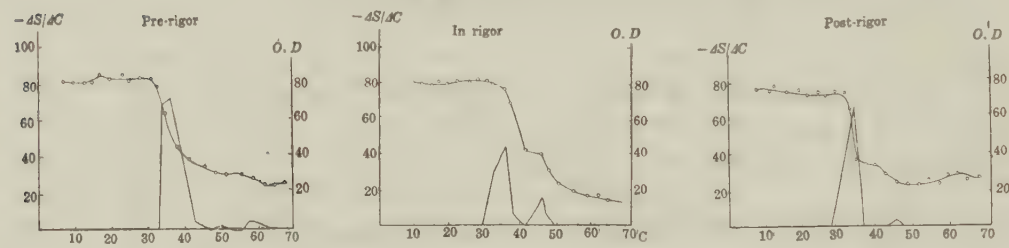


Fig. 5. Post-mortem changes of salting-out curves in mackerel myosins. (April-18-'61)

らかにしたが，海産魚では（今回用いた魚種については），苦悶死区にもアクチンの出の見られることは，全くなかつた。

III. 粘度変化

コイ，タイ，イナダ各4例，マサバ2例の硬直前・中・後の肉から抽出したミオシン区蛋白の粘度をはかり，粘度図を作つた。Figs. 6～11 は，各魚種についてその一例を示したものであるが，他の例についても

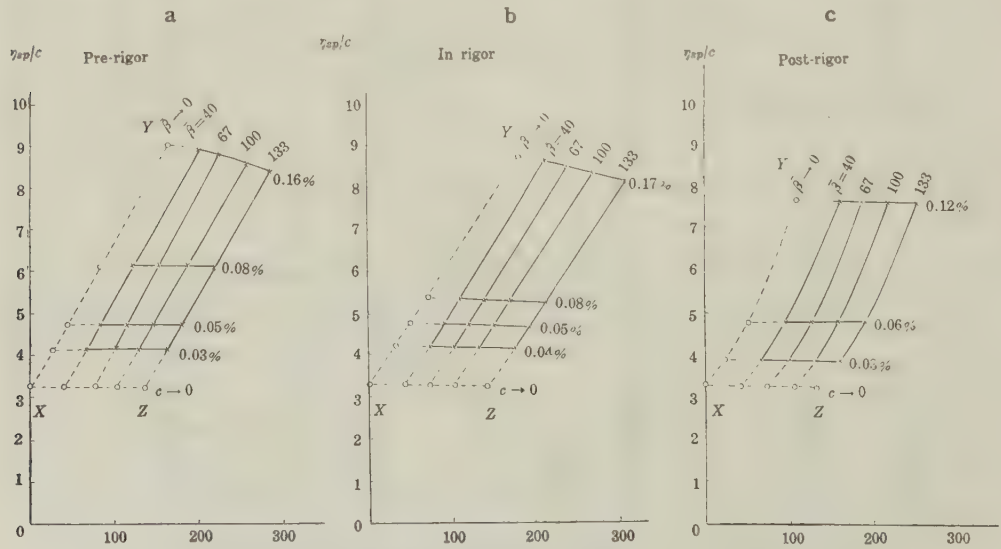


Fig. 6. Post-mortem changes of viscosity patterns of myosins from carp killed instantly (Oct.-8-'58).

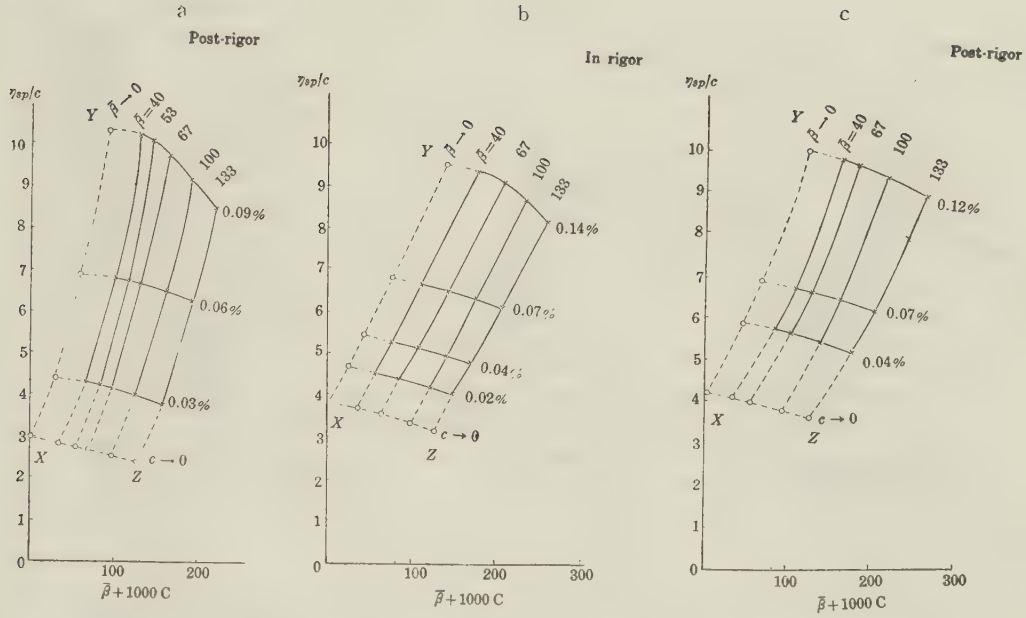


Fig. 7. Post-mortem changes of viscosity patterns of myosins from carp killed after struggle (Feb.-23-'59).

それぞれ全く同様な傾向の粘度図がえられた。図中 OX は固有粘度 $[\eta]^{c\to 0}_{\beta\to 0}$ を示し，XZ 曲線群の横軸に対する傾きは，各濃度 c における粘度の速度勾配依存性を，XY 曲線群の横軸に対する傾きは，各速度勾配における粘度の濃度依存性を示している。Fig. 12 は，死後経過の各段階におけるコイおよびタイのミオシン区蛋白について粘度の速度勾配依存性を比較しやすくするために，前報にのべた方法[2] で，各濃度における XZ 曲線群の横軸に対する傾きを，死後の各段階ごとに表わしたものである。

a) コイ肉　Fig. 6 (即殺区), Fig. 7 (苦悶死区) に明らかなように，死直後の固有粘度は殺し方にかかわらず，ほぼ同じである。しかし死後の経過につれて即殺区ではいくぶん増加の傾向がみとめられるが，苦悶死区では硬直の前後を通じてかわらない。速度勾配依存性は，死後経過の各段階を通じ，即殺区のほうが苦悶死区よりも，つねに大きい。しかし致死条件の同じものをくらべると，いずれも死後経過とともに弱まつていく。このことは，Fig. 12a にはつきり示されている。

b) タイ肉　Fig. 8, 9 は，それぞれタイの即殺区および苦悶死区の粘度図である。固有粘度 $[\eta]$ は一般にコイにくらべてやや低い。即殺区の $[\eta]$ は硬直に入つてからいくぶん上昇する傾向のみえること（ただし，コイの場合にくらべると小さい），苦悶死区の $[\eta]$ は死後経過によつてほとんどかわらないこと，また粘度の速度勾配依存性は，即殺，苦悶死両区とも，死後経過とともに次第に弱まることなど，タイのミオシン区蛋白の粘度的性質は，多くの点でコイの場合と似ている (Fig. 12b)。ただ大きく異なつている点は，粘度図の XY 曲線群が，いちじるしく横軸に傾いていること，すなわち，粘度の濃度依存性のごく小さいことである。ことに即殺区の硬直前のものでは，ほとんど濃度依存性が認められず，前報[2] の結果が確認された。死後経過にともなう粘度の濃度依存性の変化をみると，即殺区では硬直期と解硬期に，苦悶死区では全期を通じて，いくぶん濃度依存性があらわれるが，コイの場合にくらべると小さい。

c) イナダおよびマサバの肉　これがいわゆる赤身の魚と白身の魚の一般的なちがいといえるか否かは別として，イナダ，マサバは，コイ，タイと粘度的に大きなちがいがある (Fig. 10, 11)。それは (i) 硬直に入ると固有粘度がいちじるしく減少することと，(ii) 硬直前のマサバを除くと，測定に用いた濃度範囲では，速度勾配の比粘度におよぼす影響が全くみられないことである。

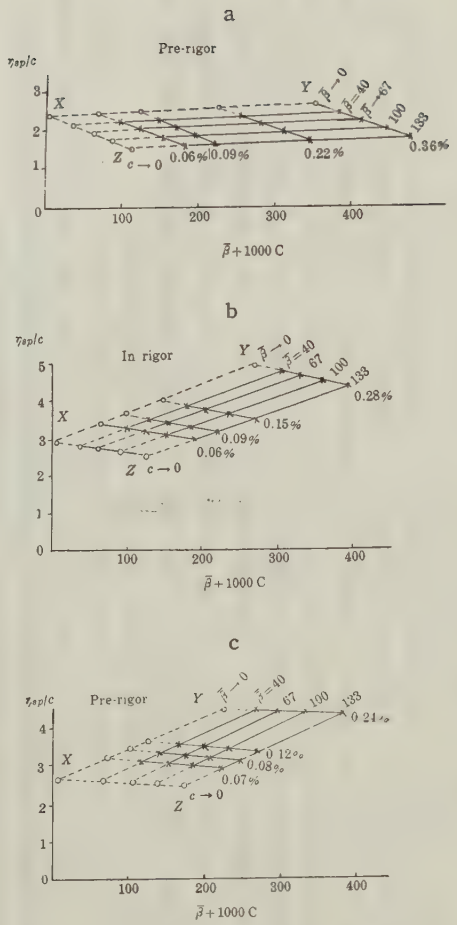


Fig. 8. Post-mortem changes of viscosity patterns of myosins from red sea-bream killed instantly (June-28-'60).

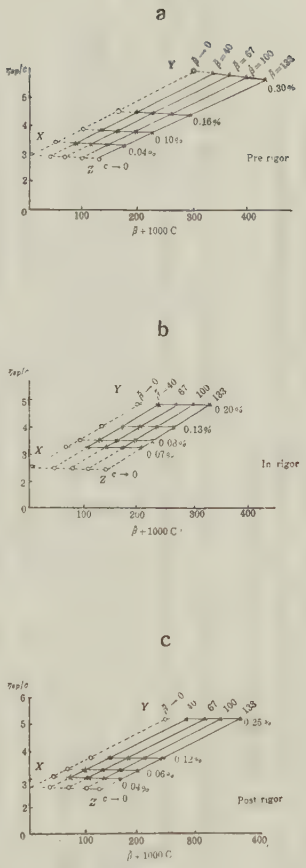


Fig. 9. Post-mortem changes of viscosity patterns of myosins from red sea-bream killed after struggle.
(June-28-'60)

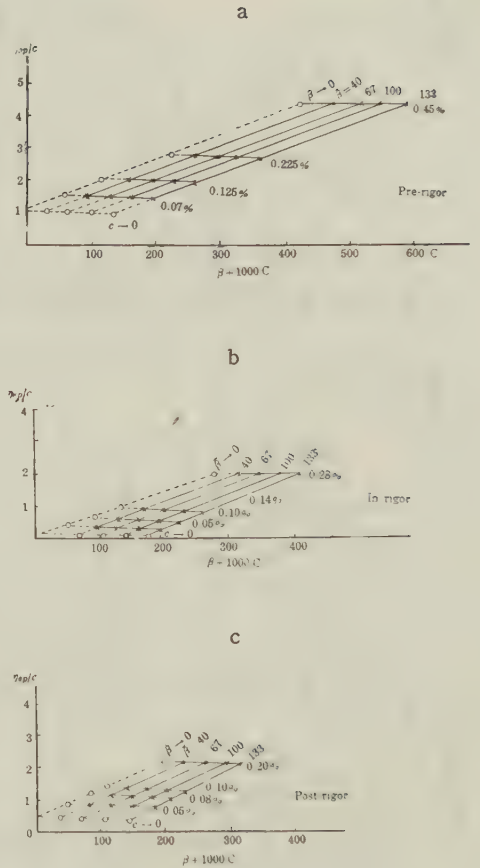


Fig. 10. Post-mortem changes of viscosity patterns of myosins from yellow tail killed instantly (Oct.-27-'60).

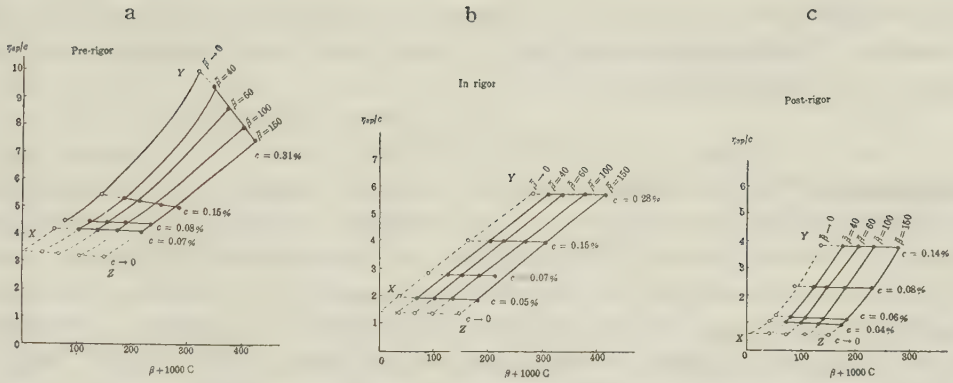


Fig. 11. Post-mortem changes of viscosity patterns of myosins from mackerel killed instantly (April-18-'61).

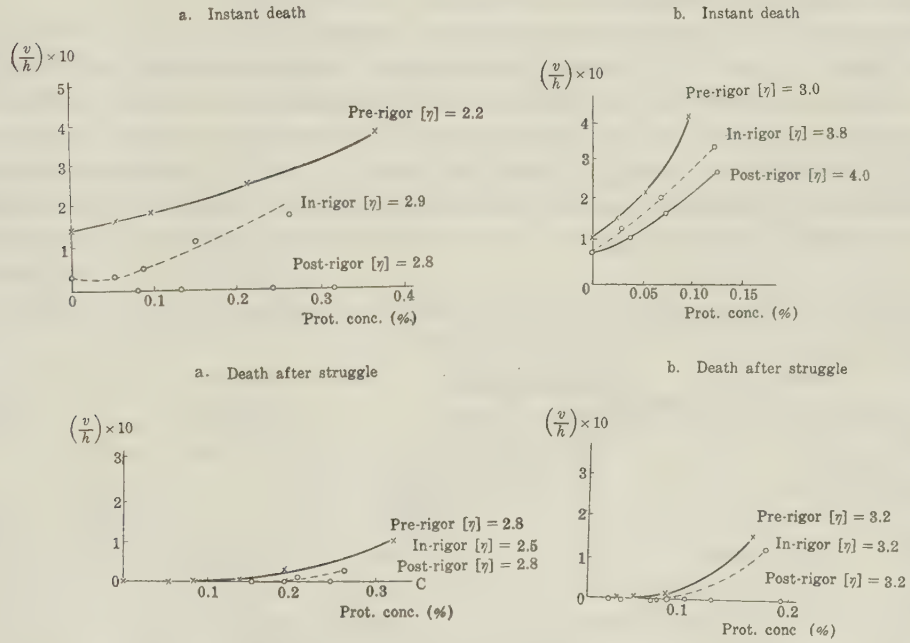


Fig. 12. Concentration effects on velocity gradient dependence of myosins.
a.····Red sea-bream b.····Carp
v/h: relative slope of each XZ line for different concentrations in the viscosity patterns of Fig. 7, 9. For details see the previous paper[2].

硬直前・中・後の固有粘度をみると，イナダでは，1.0, 0.2, 0.5; マサバでは，4.2~3.2, 1.2~1.0, 1.0~0.5 である。固有粘度 4, 3, 1, 0.5 はそれぞれ軸比 70, 60, 30, 20 に相当する。したがつて，コイ，タイと同程度の固有粘度をもつ未硬直のマサバを除き，異常粘性（速度勾配によつて粘度のかわること）の全くみられないことは，分子の非対称性の小さいことと密接な関係があると考えられる。マサバは未硬直の時期には粘度的にコイ，タイとあまりちがわないが，硬直期に入ると，粘度は下り，粒子の非対称性の小さくなつたことを示し，同時に異常粘性がみられなくなる。

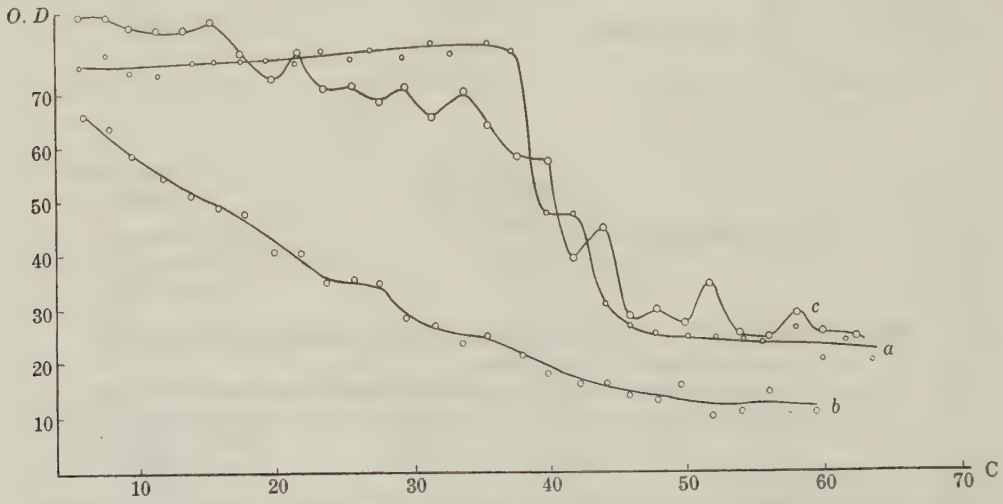
なお赤身の魚は，一般にかまぼこを作りがたく，また，死後比較的はやくかまぼこを作る性質を失なうが

これは粒子の非対称性がはじめから小さいか，または死後急速に失なわれることに関係があるように思える。なぜならば，ゲルの弾力はその網目構造に負うところが多く，一方，粒子の非対称性が小さくなるほど網目構造を作るに不利となるからである。

考　　察

塩析曲線の信頼度　著者らは塩析分析の結果を論じるにあたつて，すでに述べたようないろいろの理由から，硫安の飽和濃度 30～40% の山をアクトミオシン，40～45% の山をミオシンに相当するものとみなした。しかし，アクトミオシンとミオシンの塩析域は前述のように発表者によつてちがつている。このなかには実験条件のちがいが，その原因となつている場合もあるかも知れない。しかし，当研究室において三人の測定者に同一試料を同じ条件の下に塩析分析せしめた結果，測定者がちがうと，塩析図の山の位置が多少ずれたり，小さい山が出たり出なかつたりすることは避けられないことがわかつた。この理由の一つとして考えられることは，各濃度における吸光度の測定値に多少のばらつきがあり，そのため吸光度 (S)～硫安濃度 (C) 曲線の作図に個人的の差が生じ，したがつて，その曲線から導かれる塩析図に，人によつて小さい山が出たり，出なかつたりする結果になるのではないかということである。

そのうえ塩析分析には，試料の性質からくる問題がある。魚種や条件のちがつたいろいろの試料についてえられた塩析分析の結果をみると，塩析曲線 (S～C 曲線) に自ずから特異の型のあることがわかつた。Fig. 13 は季節のちがつたコイのミオシン区蛋白についてえられた多数の S～C 曲線から，代表的な三つの型を示したものである。すなわち，吸光度と濃度の関係を曲線の形の上からみると，曲線 a のように，はつきりとしたZ字形曲線で表わされるものと，b のように，だらだらと下つていく曲線で表わされるものの二つに大別できるが，さらに c のように，だいたいの形は a に似ているが，測定値のばらつきが相当あつてなだらかに曲線にのりにくいものもある。a に属するものは，6月から9月にかけてのコイのほか，いままで用いたほとんどすべての海魚（セイゴ，タイ，ハゼ，サバ，イナダ）がそうである。b に属するものは，Fig. 13 の付表に示すように，だいたい冬期のコイ，c に属するものは，春秋のコイ，および苦悶死した海



Type of Salting out curve	b	b	b	c	c	c	c	a	a	a	a	a	c	c	a′	a′	a′	b	b
Date	Feb.			Mar.			Apr.	June	July	Aug.		Sept	Oct.		Nov.			Dec.	
	4,	24,	29	14,	16,	22	20	30	22	4,	6	2	20,	21	11,	14,	27	9,	11

Fig. 13. Different types of salting-out curve in carp myosins.

魚にしばしばみられた。*b* に属するものは，とくに塩析図（$-\Delta S/\Delta C \sim c$ 曲線）を導き出す意味は少なく，*c* に属するものでは，曲線の小さい山の信頼度は低い。このように $S \sim C$ 曲線に型の相異がある原因はなんであるか，目下のところわからない。もし，これに意味づけができたら，塩析曲線を求めることに，いままでとちがつた意味が新たに加わることになるかも知れない。

粘度の死後変化について　コイおよびタイの固有粘度は，即殺区では硬直期以後増加の傾向がみられたが，苦悶死区のものは，死後経過によつて変わらなかつた。一方，粘度の速度勾配依存性（異常粘性）は，即殺，苦悶死両区とも，硬直前・中・後の順に弱くなつている。固有粘度は，粒子が外力も分子間の相互作用もうけず，ただブラウン運動を行なつている状態における粒子の，すなわち，粒子本来の非対称度を示す尺度である。また異常粘性は流れの場における粒子の配向と熱運動による拡散とのかねあいできまり，粒子の非対称度と長さに関係し，糸状粒子では特に長さの影響が強いとされている。したがつて，即殺コイやタイの場合，死後経過とともに粒子本来の非対称度がいくぶん増しているのに，異常粘性がかえつてよわまつているのは，(i) もし粒子を流れの場においてずりの応力により変形しにくいものとすれば，死後経過につれて，粒子の非対称性はいくぶん大きくなるが，長さが短かくなつたと考えねばならない。また，(ii) もし粒子を応力によつて変形しうるものと考えれば，死後経過にともない，粒子本来の形は非対称性のやや大きいものとなる（ただし (i) の仮定の場合と異なり，長さは短かくなる必要はない）が，流れの場においてずりの応力によつてひき伸ばされ難くなるのではないかと想像される。しかし現在のところ，この二つの仮説の当否を判定するに充分な実験的事実がない。ただ BATE-SMITH と BENDALL[6] が，ウサギ肉について，死後硬直に入ると，筋センイの伸びる性質がはなはだしく減少するとともに，0.6 M KCl で抽出されるミオシン区蛋白の量は，著しく減るが，LiCl や KI のような能率のいい溶剤を用いると溶出量に変化のないこと，またその溶出粒子を電子顕微鏡でみると，硬直前の場合と同じような filament の破片からなることから，硬直に入ると分子間結合が増すのではないか，そしてこれが伸びる性質の減少する原因ではないか，といつていることは注目に値する。

イナダではすでに死直後から，またマサバでは硬直前を除くと，固有粘度がいちじるしく小さい。従来報告されているアクトミオシンおよびミオシンの固有粘度は，それぞれだいたい 3～5 および 2 付近にある。各期のイナダおよび硬直期以後のマサバのミオシン区蛋白の固有粘度が 1.0～0.2 というのは，アクトミオシンまたはミオシンとしてはあまりにも小さい。その溶液が異常粘性を示さなかつたことは当然である。それにもかかわらず，塩析図はいずれもアクトミオシンと推定される山によつてほとんど占められており，またイナダのミオシン区分について ATP-sensitivity をはかつたところ，0.5% 溶液における硬直の前・中・後の値は，それぞれ 107, 78, 44 であつて，死後経過とともに減少の傾向はあるが，アクトミオシンの存在がはつきり認められる。すなわち，本質的にはアクトミオシンである。それにもかかわらず，ごく低い固有粘度を示すのは，そのアクトミオシン粒子が，いちじるしく fold された形をとつているのか，あるいはアクトミオシン分子が，主として横の方向に凝集しているのではないかと想像される。そこではたして凝集がおきているか否かをたしかめるため，目下粒子量の測定を行なつている。

摘　　要

魚の死後経過（死直後，硬直中，解硬後）にともなうミオシン区蛋白の変性を，溶出量，塩析曲線，粘度を尺度とし，それが致死条件および白身の魚，赤身の魚によつてどう変わるかを調べた。

I．溶出量　ブレンダー抽出の場合，溶出量は致死条件や魚種（タイ，ハゼ，イナダ，マサバ）に関せず，硬直中が，その前後よりも大きい傾向がみられた (Fig. 1)。

II．塩析曲線　1. タイ (Fig. 2)，ハゼ (Fig. 3)，イナダ (Fig. 4)，マサバ (Fig. 5) のミオシン区蛋白は，塩析曲線からみると，その主成分は，死後の各段階とも，ほとんどアクトミオシンのみからなつていると思われる。致死条件の影響もみられなかつた（タイ，ハゼ）。

2. アクトミオシンの山以外にも，それが何であるか確かでない小さい山がみられるが，その出現は魚種

によつてすべてちがつていた。

3. 塩析曲線（吸光度～硫安濃度曲線）は作図のさい個人誤差が入りやすく，それから導かれる塩析図の山の位置の多少のずれや，小さい山の出現には再現性がない。

4. 魚の種類，魚の条件によつて，塩析曲線の型にはつきりしたちがいがある。曲線がだらだらと下がつていくため，その微分曲線（塩析図）を求める意味の少ない場合（冬季のコイ）や，測定値のばらつきが大きく誤差の入りやすい場合（春秋のコイ）もある (Fig. 13)。

Ⅲ. 粘度的性質　1. 白身の魚（コイ，タイ）では，即殺区の固有粘度は，硬直前・中・後の順に大きくなるが，苦悶死区では死後ほとんど変化がみられなかつた。粘度の速度勾配依存性は，即殺区，苦悶死区いずれも，死後経過にともない次第に弱くなる (Fig. 6, 9, 12)。

2. 赤身の魚（イナダ，サバ，いずれも即殺）では，固有粘度が硬直期からごく小さくなり，約 0.2～0.5 にまで減少した。粘度の速度勾配依存性は，白身の魚にくらべ概してよわく，硬直期以後は用いた濃度範囲ではほとんど見られなかつた (Fig. 10, 11)。

実験結果の解釈について，有益な御意見をよせられた松本重一郎・岡田　稔・平野　弘の三氏に深謝いたします。

文　　献

1) 右田正男・大竹茂夫：本誌，**26**，140 (1960).
2) 右田正男・鈴木たね子：本誌，**27**，774 (1961).
3) SNELLMAN, O., TENOW, M.: Biochem. et Biophys. Acta **13**, 199 (1954).
4) 斎藤　要・日高富男：鹿大水産学部紀要 **4**，90 (1955).
5) ERDÖS, T.: Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged **3**, 51 (1943).
6) BATE-SMITH, E. C., BENDALL, J. R.: J. Physiol. **106**, 177 (1947).
7) WIERBICKI, E. et al.: Food Tech. **10**, 80 (1956).
8) 右田正男・松本重一郎：本誌，**24**，51 (1958).
9) 右田正男・松本重一郎・鈴木たね子：本誌，**26**，925 (1960).
10) DUBUISSON, M.: Experienzia **2**, 412 (1946).
11) YASUI, T. et al.: J. Biochem. **45**, 717 (1957).
12) 右田正男・鈴木たね子：本誌，**25**，319 (1959).
13) HASSELBACH, H., SCHNEIDER, G.: Biochem. Z. **321**, 461 (1951).
14) 上田侃男・志水　寛・清水　亘：本誌，**27**，150 (1961).

水産ねり製品の足に対する酸化剤の増強効果

岡 田 稔・中 山 正 夫

(1960 年 12 月 23 日受理)

THE EFFECT OF OXIDANTS ON JELLY STRENGTH OF KAMABOKO

Minoru Okada* and Masao Nakayama**

Kamaboko, a traditional fisheries product in Japan, is an elastic jelly with high jelly strength made from fish meat. Its elasticity and jelly strength depend on the kinds of fish used and the manufacturing process. It is accepted that both hydration of muscle protein and formation of network of hydrated protein are two important factors for elastic jelly and hence for elastic Kamaboko. Objective of this investigation was to find a new method of strengthening Kamaboko by use of oxidants which would promote cross linking of protein molecules by the following reaction,

$$2\,SH \longrightarrow S\text{-}S$$

Addition of oxidants such as potassium bromate was shown to make an elastic jelly out of fish meat with low ability of jelly formation such as horse mackerel, from which only a brittle, easily crushable and synerizing jelly can be made. Simulataneous measurement of sulfhydryl groups of cooked meat clearly demonstrated that an elastic jelly was formed (as shown by decrease in the amount of expressible water in Fig. 1), when sulfhydryl groups were diminished by the addition of more than one-tenth percent of bromate. A small decrease in solubility of meat protein in 3% NaCl soln. was observed after the addition of bromate even when Na-tripolyphosphate was added to the mixture (Table 4).

It was, therefore, supposed that the effectiveness of oxidants was primarily due to its action on strengthening the network of Kamaboko by cross linking protein molecules with disulfide bonds.

水産ねり製品の足は一般の弾力の強いゲルと同様，網状構造のようなゲルの骨骼構造が存在するために現われるものと考えられており，従つて足の強いねり製品ができるためには魚肉蛋白（主としてミオシン系蛋白）が食塩の添加により溶解し（肉蛋白の水和），加熱によつてこの水和した肉蛋白がからみあつて丈夫な網状構造をつくることが必要であるとされている。

したがつて水産ねり製品中に網状構造が形成されるさいには，からみあつた蛋白分子間にいろいろな側鎖結合による架橋が行なわれ，網状構造が安定されると考えることができる。このさい架橋にあずかる蛋白分子間の側鎖結合としては，イオン結合,水素結合,S-S 結合などが考えられるが，このうち S-S 結合の存在については疑問がある。なぜなら塩ずり肉を加熱する場合には酸化還元電位が著しく低下することが知られており[1]，これは肉蛋白の加熱変性によつて SH 基が現われるためと考えられる。また足の強いねり製品にも足の弱い製品にも同じように多量の SH 基が存在しており[2]，$2SH \rightarrow S\text{-}S$ の反応による蛋白分子間の架橋がねり製品中の網状構造形成に大きく関与していると考えられないからである。本研究はねり製品中の網状構造形成には与かつていないと思われる多数の SH 基を酸化剤の使用によつて S-S 結合に変え，蛋白分子間に架橋を行なわせることによつて，網状構造を強化し，ねり製品の足の増強を企図したものである。

東海区水産研究所業績 B 第 342 号

* 東海区水産研究所 (Tōkai Reg. Fish. Lab., Chuō-ku, Tokyo, Japan).

** 千代田化学工業所 (Chiyoda Kagaku Kōgyō-syo, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan).

実 験 方 法

実験材料としては主にマアジ肉を用いた。東京市場で入手しうる程度の鮮度のアジ肉はカマボコ形成能が弱く，足の増強効果をみるのに便利であるからである。1/4～1/3 重量の水を加えたマアジ精肉を 3% の食塩と擂潰して塩ずり肉をつくり，これにいろいろな薬品を加えて充分混和後，ケーシングにつめて 80～90°C で加熱，一晩放冷後測定に供した。

足の強さの判定は官能的に行なうとともに，直径 3cm，厚さ 0.5cm の円板状の試料片を折り曲げた場合の破壊の有無*（屈折破）を観察し，また圧出水分（10kg/cm², 10 秒加圧したさいに圧し出される水分量）の測定を行つた。従来よく用いたプランジャー加圧式のゼリー強度計による測定は本実験では補助的に行なうに止めた。これは本実験で用いたアジ肉は殆んどカマボコ形成能を失ない，精製な塩ずり肉をつくつても加熱すると弾力に乏しく脆い水の出易いいわゆるツミレ型のゼリーをつくり，このゼリーは相当に硬いためゼリー強度としては高い測定値を与え，この場合にはゼリー強度の大小が足の強弱を示さないからである。

SH 基の測定は赤血塩法によつた。この方法で示めされた還元値をそのまま SH 基量とみなすことには問題があるが，とりあえず本実験では森らの方法[3]に準じ，加熱魚肉の水懸濁物を赤血塩で酸化し，$FeSO_4$ を加えて生ずるプルシアン青の青色を光電比色計により 680mμ で測定した。なおブロム酸カリなど酸化剤を加えた試料肉ではプルシアン青の形成が阻害されるため，この方法で SH 基の測定が不能であつた。このため予め酸化剤を水洗除去して測定を行なうこととした。すなわち 10 倍量の水を加えた肉をブレンダーにかけて懸濁液をつくり，遠心分離して上澄を除き沈澱肉を再び水に懸濁して遠心分離する。この方法をくりかえして肉を 6 回洗滌すると酸性で KI を加えてもヨード反応はみられず，酸化剤は除き得たと判断される。本実験ではさらに 4 回洗滌を繰返し都合 10 回行なつた。水洗による影響をさけるため対照の酸化剤無添加試料も平行して 10 回洗滌を行ない，同時に遠心分離して得られ沈澱肉を各々 1g づつとり SH 基の測定に供した。図表中の SH 基の測定値は便宜上このように処理した対照試料肉の値を 100 とし，その百分率で現わした。

実 験 結 果

1. 酸化剤の種類による影響

手持の酸化剤 8 種を用い，酸化剤の種類によつてねり製品の足に対する影響がどうちがうかをみた。すなわち，肉中の水に溶けて 0.01 モル溶液をつくるように酸化剤をアジ塩ずり肉に混和して試料をつくり，比較検討した。Table 1 に示したように酸化剤無添加の対照は弾力が乏しく脆いツミレ型のゼリーであるのに対し，酸化剤を添加した場合の大部分は弾力のあるカマボコ型のゼリーをつくり，官能的にも，また圧出水分量の少ないことならびに折り曲げた時に破壊し難くなることからも酸化剤による足の増強効果が認められた。ただし実験に用いた酸化剤のうちヨード酸カリおよび過硫酸アンモンの二者には増強効果が認められなかつた。ヨ

Table 1. Properties of cooked jelly treated with oxidants.

Oxidant added	Jelly strength	Expressible water %	Ease of* rupture	Organoleptic judge	pH
None	290	48.8	+	Brittle jelly	6.14
$NaClO_3$	280	45.5	±	Elastic jelly	6.12
$NaBrO_3$	305	41.5	−	〃	6.08
$KBrO_3$	325	42.3	−	〃	6.07
KIO_3	285	48.5	++	Brittle jelly	6.08
$K_3Fe(CN)_6$	325	46.7	±	Elastic jelly	6.00
$(NH_4)_2S_2O_8$	300	47.4	++	Brittle jelly	5.72
$K_2Cr_2O_7$	200	44.7	±	Elastic jelly	6.51
$KMnO_4$	300	46.2	±	〃	6.30

* When test pieces (diameter 3cm, height 0.5cm) was folded, ++: easily breaked, +: cracked, −: not breaked.

* 足の弱い試料は容易に割れ，足の強い試料は破壊しない。

ード酸カリを塩ずり肉に添加すると擂潰中にゲル化が起こること，過硫酸アンモンの場合には加熱後の肉の pH が低下し脱水が起きることが観察された。

以後の実験には足の増強効果が強く，また小麦粉の品質改良剤として食品衛生法で認められているブロム酸カリを用いることとした。

2. ブロム酸カリの添加量と足の増強効果

上記の実験では酸化剤の添加量を肉中の水に溶けて 0.01 モル溶液をつくるのに必要な量*としたが，ブロム酸カリの添加量をいろいろに変えて添加量と足の増強効果との関係をみた。

実験結果は Table 2 および Fig. 1 に示したとおりである。対照の無添加のものはツミレ型の脆いゼリーであるのに対し，ブロム酸カリを塩ずり肉に 0.1% 以上添加したものはカマボコ型の弾力のあるゼリーとなり，さらに添加量が 0.2% 以上になるとカマボコとしての足の強さはいちじるしく増し，足の増強効果がはつきりと認められる。なお Table 2 で判るようにブロム酸カリを添加すると僅かであるが肉の pH が低下する傾向がある。

Table 2. Effect of varying amount of potassium bromate on properties of cooked jelly.

Amount of $KBrO_3$ %	Expressible water %	Ease of rupture	Organoleptic judge	pH
0	44.8	##	Brittle jelly	6.30
0.05	42.2	##	〃	—
0.1	39.4	#	Elastic jelly	—
0.2	38.5	—	〃	6.22
0.3	37.5	—	〃	—
0.4	37.0	—	〃	6.20
0.5	35.7	—	〃	—

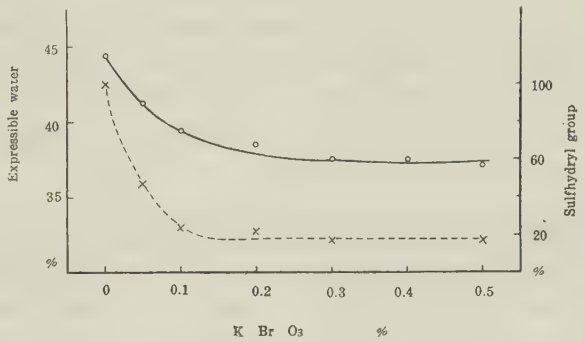


Fig. 1. Effect of potassium bromate on expressible water and sulfhydryl group of cooked jelly.
○——○ Expressible water
×····× Sulfhydryl group

3. ブロム酸カリ添加による SH 基の変化

ブロム酸カリを添加すると試料肉中の SH 基量は Fig. 1 にみられるようにいちじるしく減少する。一方，ブロム酸カリの足の増強効果は官能的にもまた圧出水分の測定結果からも 0.1～0.2% 添加ではつきり認められ，これは SH 基量の減少が殆んど終つた時のブロム酸カリ濃度と一致し，SH 基の減少と足の増強効果との間に密接な関係があるように思われる。

考　　察

1. 酸化剤のねり製品の足に対する増強効果

小麦粉を水，酵母などと混合，ねり合わせてつくるパン生地（ドウ）の物理的性質は，これを焼成してつくるパンの性質を決めるものであり，このドウの性質は小麦粉の主要蛋白であるグルテンが形成する網状構造の性質によつて決められる[4]。例えば $NaHSO_3$ のような還元剤を加えるとドウは軟化して製パンに不適なものとなるが，これはグルテン分子内の S-S 結合が切れて分子に fragmentation が起きたためとされている。またブロム酸カリ，過硫酸アンモンなどの酸化剤はグルテン分子間に $2SH \rightarrow S\text{-}S$ の反応によつて架橋を起し網状構造を強化してドウの物理的性質を改良すると考えられており，パン製造に広く応用されている。

* ブロム酸カリの場合，約 0.2% に相当。

このようにドゥの網状構造ではSH基の関与する架橋が極めて重要な役割をなしているが，水晒ねり製品中の肉蛋白による網状構造では次のような理由によってSH基の関与している架橋がそれほど重要な役割を果しているとは考えられない。すなわち，ねり製品中には足の強い製品でも，弱いものでも同様に多量のSH基が存在しており，SH基量と足の強さとの間には殆んど相関がないとみられている[2]。ねり製品中のこのSH基の大部分は加熱による肉蛋白の変性に伴なって出現するものであるが，もし加熱にあたって出現するSH基がS-S結合に変わって蛋白分子間の架橋に使われるものであるなら，丈夫な網状構造をもつ足の強い製品ほどS-S結合が多い，したがってSH基が少ないと考えられるからである。しかし，本実験の結果では単独では弾力のあるカマボコをつくり得ないようなアジ肉からもブロム酸カリなどの酸化剤を加えることによって弾力のあるカマボコをつくることができ，このさいSH基量が著しく減少することが認められた(Fig. 1)。酸化剤を添加した試料中のSH基が少ないことは加熱変性によって出現する蛋白のSH基が酸化されてS-S結合に変えられたためと考えられよう。一方，酸化剤を加えることによって同じ擂り肉がツミレ型のゼリーからカマボコ型の弾力のあるゼリーに変ったことは，酸化剤の作用によって丈夫な網状構造が形成されるようになったことを示すものであり，この網状構造の強化には酸化剤の作用によって生成されたS-S結合による架橋が重要な役割をなしていると推論されよう。

以上のことから酸化剤がねり製品の足に対して増強効果をもっているのは，その酸化作用によって通常のねり製品中ではその網状構造に関与しないで存在しているSH基をS-S結合に変え，蛋白分子間に架橋をおこさせ，ねり製品中の網状構造を強化するためと考えられる。

実験に用いた酸化剤のうちパン生地に対し強い改良効果を示すヨード酸カリおよび過硫酸アンモンの二者にはねり製品の足に対する増強効果を認めることができなかった。過硫酸アンモンを添加した場合には加熱肉のpHが低いこと，また加熱後に脱水が起きていたことから考え，酸性基の強酸である過硫酸アンモンは水中で加水分解して酸性を呈するため肉蛋白の水和を阻害し足の増強効果を示さないのであろう。またヨード酸カリはそのパン生地に対する効果がブロム酸カリなどにくらべ遅かに現われることが知られているが，魚肉の場合でもヨード酸カリを加えると擂潰中に肉のゲル化が起ることが認められた。一度ゲル化した肉を擂潰し直してカマボコにすると足が著しく低下することはよく知られた事実であるが，ヨード酸カリが足の増強効果をしめさないのは，その肉をゲル化させる力があまりにも強いので，丁度ゲル化した肉を擂潰し直すことになるためと考えられる。

2. 多燐酸塩との比較

数年前よりねり製品の足の増強剤として多燐酸塩が広く用いられている。この多燐酸塩とブロム酸カリの効果を比較してみるとブロム酸カリは多燐酸塩にはみられない強い足の増強効果をもっている。Table 3のようにアジ肉に0.4%のトリポリ燐酸ソーダ*を加えても対照と同様ツミレ型の脆いゼリーをつくるだけであるが，ブロム酸カリを加えれば弾力のあるカマボコ型のゼリーが得られる。

Table 3. Properties of cooked jelly treated with potassium bromate or tripolyphosphate.

Treatment	Expressible water %	Ease of rupture	Organoleptic judge	pH
None	40.9	＋	Brittle jelly	6.30
0.4% tripolyphosphate	39.6	＋	〃	6.31
0.2% $KBrO_3$	32.2	−	Elastic jelly	6.22
0.4% $KBrO_3$	32.0	−	〃	6.20

肉蛋白の溶解性に対する影響をみるとトリポリ燐酸ソーダは蛋白抽出量を著しく増し，肉蛋白の水和を増進させる働らきがあるのに対し，ブロム酸カリは逆に肉蛋白の溶解を妨げる傾向がある。すなわちアジ肉を10倍量の水とともにブレンダーにかけてつくった肉の水懸濁液に3%重量の食塩を混和し，30分放置して抽出を行ない，遠心分離して上澄液中の溶解蛋白量を求める。一方，食塩を添加するさい，そ

* 単独使用の場合には最も足の増強効果の強い多燐酸塩[5]

天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究—XI.

ビタミンA濃縮物のエステル化（其の3）

フタル酸類のジビタミンAエステル

衣 巻 豊 輔

（受付：昭和 36 年 4 月 24 日）

STUDIES ON THE ECONOMICAL MANUFACTURE OF VITAMIN A CONCENTRATE FROM FISH LIVER OIL—XI.

ESTERIFICATION OF VITAMIN A CONCENTRATE

3. DIVITAMIN A ESTERS OF PHTHALIC ACIDS

Toyosuke KINUMAKI*

The work described in this paper was undertaken to find out whether esters of phthalic acids are suitable for economical preparation of crystalline vitamin A ester from concentrate.

Phthalic acids used in the experiments included ordinary phthalic, terephthalic and iso-phthalic.

i) Preparation of esters

Each of the phthalic acids was converted to acid dichloride and then made to react with vitamin A concentrate respectively as in the previous paper (Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. **20**, 1027, 1955).

Recovery of vitamin A in the esterification was not constant in each test and generally was low (shown in Table 1). The low recovery can be attributed to the presence of acidic monoesters which are produced by the use of excess acid dichlorides. The monoesters cause the loss of vitamin A into water and promote emulsification in the alkali washing procedure.

ii) Fractionation of esters

The esters thus obtained could not be crystallized. Poor results were also obtained in the fractionation of these esters by solvent distribution, molecular distillation and chromatographical adsorption. See Tables 2 and 3.

The poor results may be explained as follows. Diesters prepared from a dibasic acid and various alcohols are the mixture of many diesters each having two bindings either of different alcohols or of identical alcohols. Obviously it is difficult to isolate an individual diester from this complicated mixture of diesters similar to each other in properties.

In the case of ordinary phthalate, a fraction showing the presence of anhydrovitamin A was obtained. This means that a part of vitamin A is changed into anhydrovitamin A in esterification or subsequent treatments.

iii) Preparation and crystallization of synthetic vitamin A terephthalate

In order to confirm the supposition that the difficulties in isolation of an ester was due to the presence of other alcohols in the concentrate, synthetic pure vitamin A was made to react with terephthalyl dichloride. In this case the ester prepared was easily crystallizable. This ester (m.p. 55–56°C, vitamin A potency: 2560000 I.U. per gr.) was divitamin A terephthalate (Figs. 1 and 2).

* 東海区水産研究所 (Tōkai Reg. Fish. Res. Lab., Chuō-ku, Tokyo, Japan).

東海区水産研究所業績 B 第 339 号

緒　　言

ビタミンA（以下単にAと記す）を結晶とするには，エステル，エーテル，ウレタン等の誘導体とする方法があるが，この内エーテルはAアルコールから直接合成することが困難であるし，ウレタンは鹸化により遊離のAアルコールを回収する点に難点を有している。したがつてA濃縮物を結晶化して利用する目的にはエステルが適している。

ところで，現在までに知られているAのエステルは11種である[1),2)]が，この中でA濃縮物よりAエステルの結晶を得るために応用されているのはアセテイト，β-アントラキノン・カルボキシレイト，*p*-フェニルアゾベンゾエイトなど数種に過ぎない。しかも，これらのエステルは結晶を生成させるためにA濃縮物をあらかじめ非常に純化する必要があつたり，Aの損失なくエステルを作るためには操作が繁雑となつたり，エステル化に要する試薬が高価である等の欠点を有している。

したがつて，Aエステルの結晶を経済的に製造するには，A濃縮物をそれ程純化しないでも結晶が得られ，しかもエステル化試薬が安価であるような新しいエステルを見出すことが望まれている。

著者は最近工業的に多量に製造されるようになつたフタル酸類（フタル酸，テレフタル酸およびイソフタル酸。以下それぞれ **P 酸**，**TP 酸**，**IP 酸**と略す。）がAの結晶性エステルを製造する目的に適したものと考え以下の実験を行なつた結果をここに報告する。

実　験　の　部

1) 装　置

第 VI 報[3)]の装置と同様である。

2) 試　薬

使用した試薬は酸クロリドを除いては第 VI 報と同様である。酸クロリドはつぎに示すようなものを使用した。なお今後の実験において酸クロリドの合成に使用した **TP 酸**，**IP 酸**はすべて川崎化成工業株式会社により提供されたものである。

P 酸ジクロリド。　市販最純対称型フタル酸ジクロリドをそのまま使用した。

TP 酸ジクロリド。　**TP 酸**に過剰の五塩化燐，触媒として少量の無水塩化亜鉛および溶剤としてオキシ塩化燐を加え，加熱反応させ，得られた粗クロリドを石油ベンジンで再結した融点 83～84°C の結晶。

IP 酸ジクロリド。　**IP 酸**より **TP 酸**の場合と同様に合成，精製を行なつた融点 43～44°C の結晶。

3) 実験方法ならびに結果

a. エステルの製造

酸ジクロリドを，A濃縮物を全部Aと仮定した理論量の 1.1～1.2 倍，ピリジンを酸クロリドに対する理論量の2倍使用し，第 VI 報[3)]と同様にベンゼン中で反応させた。酸ジクロリドを加え終つてから 40～50°C に約1時間放置し，反応生成物は第 VI 報と同様に酸，アルカリ，水の洗滌操作を行なつた。このようにして得られたA濃縮物のジエステルの性状および収量を Table 1 に示す。これより明らかなようにA回収率は一般に不良でかつ一定しなかつた。また吸光比がエステル化後かなり増加する場合もある。これはエステル化およびその後の処理においてAが一部変化していることを示している。

A回収率が悪いのは洗滌に際してエマルジョンを形成しやすく，一部のAが損失するためであるが，操作中Aがアンヒドロ A になつたり（次項参照），酸化したりすることによる損失も考えられる。

b. エステルの分別濃縮

溶剤による分別。　前項において得たA濃縮物とフタル酸類とのエステルは非常に粘稠な油状物ないしは樹脂状物であつて，石油エーテル，ベンゼン，シクロヘキサン，アセトン，蟻酸エチル等には可溶であるがメタノール，エタノール，イソプロパノール等にはほとんど溶けない。これらの溶剤を単独または混合したものにエステルを溶かし，冷却したが油状物が分離するだけで結晶は得られなかつた。そこで油状物をとりAの濃縮状況をみたが，Table 2 に示すように良好な成績は得られていない。

Table 1. A 濃縮物の P 酸, TP 酸および IP 酸エステルの製造
Preparation of phthalate, terephthalate and isophthalate of vitamin A concentrate.

試験番号 Test No.	エステルの種類 Kind of ester	A 濃縮物試料 Original vitamin A concentrate: 重量 Weight g	A単位* Vitamin A potency 10^4 I.U./g	吸光比 E value ratio 300mμ/325mμ	生成したエステル Ester produced: 重量 Weight g	A単位** Vitamin A potency 10^4 I.U./g	吸光比 E value ratio 300mμ/325mμ	Aの回収率 Vitamin A recovery %
1	P酸エステル phthalate	1.88	193.2	0.66	2.70	104.6	0.62	78
2		1.74	176	0.64	1.91	154.5	0.67	97
3		2.32	192	0.65	3.09	121.5	0.69	84
4		2.39	176	0.66	3.25	118	0.69	91
5	TP酸エステル Terephthalate	21.2	13.1	0.64	24.5	10.5	—	93
6		9.90	222	0.64	9.80	156.5	0.65	70
7		2.61	189	0.66	2.30	111	0.73	52
8		2.21	189	0.67	2.35	131	0.62	74
9		9.40	75.9	—	12.40	55.6	—	97
10		8.0	77.9	—	9.70	59.3	—	92
11	IP酸エステル Isophthalate	2.21	190	0.68	2.95	151	0.67	105
12		2.54	161	0.62	2.62	123.5	0.63	78
13		2.07	167	0.68	2.96	103	0.65	88
14		6.32	179	0.59	7.94	120.5	0.63	85

* For Tables 1 to 8 vitamin A potency was calculated by $E^{1\%}_{1cm}$ 325 mμ×1900 for the concentrate (vitamin A alcohol) and $E^{1\%}_{1cm}$ 328 mμ×1900 for the ester.

Table 2. A 濃縮物の P 酸, TP 酸, IP 酸エステルの溶済分別
Solvent fractionation of phthalate, terephthalate and isophthalate of vitamin A concentrate.

種類* Kind	エステル試料 Ester used: 重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I. U./g	方法** Method of fractionation	不溶部 Insoluble fraction: 重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I. U./g	A回収率 V. A: recovery %	溶解部 Soluble fraction: 重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I. U./g	A回収率 V. A. recovery %	備考 Remarks
No. 1	2.0	104.6	A	0.5	96.3	23	1.5	65.6	47	溶解部はアンヒドロ A の吸収を示す。Sol. frac. showed absorption max. of anhydro V. A.
No. 3	3.1	121.5	B	1.7	105.5	48	1.4	77.4	29	
No. 4	3.0	118	C	1.3	155	57	1.6	98	44	
No. 11	2.5	151	D	0.4	126	13	2.1	153	85	—
No. 6	8.8	156.5	E	5.3	167	64	3.5	140	36	溶解部の極大 313mμ Sol. frac. showed max. at 313mμ
No. 9	9.8	55.6	F	8.8	57.9	93	1.0	40.6	7.5	
No. 10	9.2	59.3	G	6.8	55	65	2.4	79.6	33	—

* 第1表の試験番号を示す。 Represents ester specified under test number in Table 1.

** 方法はつぎのごとくである。Methods used are as follows.

A: 等量のアセトンに溶解 15 倍量のメタノールを加え冷却 (−20°C). Dissol. ester in equal vol. of acetone, then add 15 vols. of methanol and cool the mixture at −20°C.

B: 等量のアセトンに溶解 10 倍量のメタノールを加え冷却 (−20°C). Dissol. ester in equal vol. of acetone, then add 10 vols. of methanol and cool the mixture at −20°C.

C: アセトン, メタノール混液 (1 : 2) 10 倍量に溶解後冷却。Dissol. ester in 10 vols. of acetone-methanol mixture (1 : 2) and cool it at −20°C.

D: 5 倍量のアセトンに溶解冷却 Dissol. in 5 vols. of acetone and then cool it at −20°C.

E: 5 倍量の蟻酸エテルに溶解冷却 Dissol. in 5 vols. of ethyl formate and then cool it at −20°C.

F: 10 倍量の石油エーテルに溶解, 各 5 倍量のメタノールで 5 回抽出する。Dissol ester in 10 vols. of petr. ether and then extract 5 times each with 5 vols. of methanol.

G: 各 2.5 倍量のメタノールで 5 回抽出 Extract ester 5 times each with 2.5 vols. of methanol.

なお，この表をみると P 酸エステルは TP 酸および IP 酸エステルと異り，アンヒドロ A の吸収を示す割分を有している。したがつて P 酸エステルの場合は一部の A がエステル化または溶剤分別に際してアンヒドロ A に変化するものと考えられる。

分子蒸留による分別。 Table 1 の実験において得た No. 13 のエステルを Pot Still にいれ分子蒸留した。その結果 250°C までの温度では，ほとんど留分が得られず，それ以上の温度で蒸留した留分はアンヒドロ A の吸収を示し，残渣は一般吸収を示す濃い褐黒色となつた。

つぎに No. 5 のエステルをサラダ油に溶かし薄膜流下式蒸留器で蒸留した。この場合は 115°C で重量で約 15% の留分が得られたが，留分の A 単位はもとのエステルの単位と変らず，しかも残渣の A 単位は約 1/10 に低下した。さらに温度を高めても，もはや留出する部分はなく，残渣は一般吸収を示すようになつた。

この結果 A 濃縮物のフタル酸類ジエステルは高度真空下においても加熱により分解重合を起すため蒸留による濃縮は不可能と思われる。

クロマト吸着による分別。 常法に従い活性アルミナを吸着剤としてクロマト分別を行ない，Table 3 に示す結果を得た。A はやや濃縮されるが，A 歩留りが悪く，良好な分別成績は得られなかつた。

Table 3. A 濃縮物の TP 酸および IP 酸エステルのクロマト分別
Chromatographical fractionation of terephthalate and isophthalate of vitamin A concentrate.

エステル試料 Ester used			石油エーテル部 Petroleum ether frac. eluted			ベンゼン部 Benzene frac. eluted		
種類* Kind	重量 Weight g	A 単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	重量 Weight g	A 単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	A回収率 V. A. recovery %	重量 Weight g	A 単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	A回収率 V. A. recovery %
No. 8	2.3	131	1.4	173	80.5	0.4	44	5.8
No. 14	7.9	120.5	5.1	137	73.5	0.3	11.8	3.7

* 第1表の試験番号をかす。 Represents ester specified under test number in Table 1.

c. 合成 A の TP 酸エステルの製造ならびに結晶化

前記のように A 濃縮物よりはエステルの結晶が得られなかつたので合成 A を試料として実験した。

合成 A アセテイトの結晶を鹸化して得たアルコール（A単位: 330 万，吸光比: 0.57）1.79g を前記の条件で TP 酸ヂクロリドと反応させエステル（A単位: 229.5 万，吸光比: 0.57）2.20g を得た。A回収率は 92% である。このエステルを蟻酸エチルに溶解し冷却（−20°C）すると容易に結晶が析出した。粗結晶は 0.71g で A 単位: 218 万，吸光比: 0.52 であつた。これを蟻酸エチルで再結すると，菊花状に析出する結晶 0.54g（A 単位: 229.5 万，吸光比: 0.51）が得られた。これをなお再結を操り返しても A 単位は上昇しないので，最初に析出する部分を除き，あとから析出する結晶のみをとり再結したところ Fig. 1 に示すような淡黄色，融点 55～56°C の結晶を得た。A単位は 256 万で Divitamin A terephthalate として計算した値の 96% とな

Fig. 1. A の P 酸エステルの結晶（蟻酸エテルより再結）
Crystalline divitamin A terephthalate (Recrystallized from ethyl formate).

る。紫外部吸収曲線は Fig. 2 に示すとおりでAおよびTP酸にもとずく吸収が明かにみとめられる。

考　　察

実験の部に示したように，フタル酸類をジクロリドとしてA濃縮物と反応させた場合，一般にエステル化における A の回収率が悪く，かつ一定しなかつた。また生成したエステルの純化も困難であつて，A 濃縮物を原料とした場合，A エステルの結晶は得られなかつた。

その理由として，A 濃縮物の純化が不充分であるとか，A のフタル酸類エステルの結晶性が予想よりも悪いためとも考えられるが，著者は二塩基性酸であるフタル酸類をヂクロリドとしてA濃縮物と反応させることと自体に原因するものと考える。

すなわちフタル酸類のような二塩基性酸のヂクロリドとアルコールとの反応ではつぎの図の（I）に示したようにジエステルが生成する。

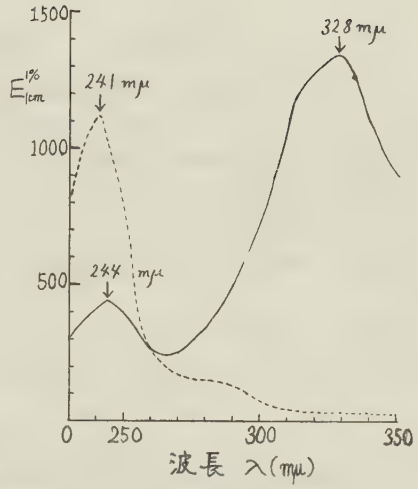
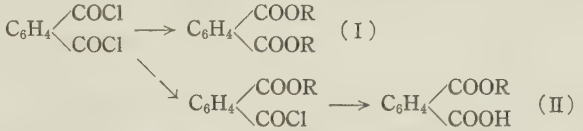


Fig. 2. A の TP 酸エステル結晶（シクロヘキサン溶液 ——）および P 酸（イソプロパノール ····）溶液の紫外部吸収曲線

Ultra violet absorption curves of crystalline divitamin A terephthalate in cyclohexane ——, and terephthalic acid in isopropanol ····.



しかし，図の（II）に示したごとく酸性モノエステルを生ずることも考えられ，酸クロリドがアルコールに対し過剰である時には，特にその生成の可能性が強い。

エステル化を完全に行なうためにはやや過剰の酸ヂクロリドを使用する必要があるので，少量の酸性モノエステルができ，これがアルカリ洗滌に際してエステル塩となり，洗液中に損失し，あるいはエマルジョンの形成を助長し，A回収率の低下をまねくものと考えられる。

また一般に酸ヂクロリドとアルコールとの反応において，反応にあずかるアルコールが1種類の時は生ずるジエステルもただ1種であるが，2種以上の時は3種以上のジエステルが生成し，アルコールの種類が多いほど，多数の組合せが考えられる。一方，A 濃縮物は A 以外に各種の高級アルコール類を含有しているから，フタル酸類のジクロリドとの反応によつて生じた A エステルは，2つの酸基がともにと A 結合しているもののほかに，一方だけがAと結合し，他の一方が別種の高級アルコールと結合しているエステルも各種生成する可能性がある。このようにして出来たエステルの性質は互に類似していると考えられるから，それらの混合物より各エステルを単離することは非常に困難となるのであろう。したがつて，反応にあずかるアルコールがAしかなければ結晶化ははるかに容易になるはずで，これは本実験の結果にみるように合成A の TP 酸エステルがたやすく結晶することにより確められた。

以上の考えよりすれば，もしフタル酸の一方の酸基のみを適当なアルコールであらかじめエステル化した後，モノクロリドとしてA濃縮物と反応させれば，ヂクロリドの場合と異り，酸性モノエステルは生成しないし，生じたエステルの種類もヂエステルの場合よりも少なくなるから結晶化は容易となるはずであるが，この検討は次報にゆずる。

摘　　要

A フタル酸類ジクロリドによる A 濃縮物エステルの製造実験を行ないつぎの結果を得た。

1) エステル化における A 回収率は一般に不良で，かつ一定した値が得られなかつた。
2) 得られたエステルは結晶化し得ないばかりではなく，溶剤分別，分子蒸留，クロマト吸着等によつても良好な分別成績は得られなかつた。
3) オルトフタル酸の場合には，エステル化または分別に際して A がアンヒドロ A に変化した。
4) 合成 A を試料としテレフタル酸エステルの結晶を得た。

本研究に当り，御指導下さつた東博士，試薬を提供された川崎化成工業株式会社・青山氏，ならびに顕微鏡写真作製に御助力下さつた竹村技官にあつく感謝いたします。

文　　献

1) H. VOGEL u. H. KNOBLOCH: "Chemie und Technik der Vitamin", dritte Auflage, Erster Band, Ferdinand Enkeverlag, Stuttgart (1950), pp. 93.
2) 佐橋佳一（代表編集委員）："ビタミン学"，金原出版，東京，(1956), pp. 115～116.
3) 衣巻豊輔：日水誌，**20**, 1027～1034 (1955).

天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究—XII.

ビタミンA濃縮物のエステル化 (其の4)
フタル酸類のモノビタミンAエステル

衣 巻 豊 輔

(1960 年 11 月 24 日受理)

STUDIES ON THE ECONOMICAL MANUFACTURE OF VITAMIN A CONCENTRATE FROM FISH LIVER OIL—XII.

ESTERIFICATION OF VITAMIN A CONCENTRATE
4. MONOVITAMIN A ESTERS OF PHTHALIC ACIDS

Toyosuke KINUMAKI*

In the previous paper (Series XI), the author showed that the esterification of vitamin A concentrate with phthalyl dichloride have disadvantage due to the formation of acidic monoesters and many kinds of diesters resembling each other in properties.

In the present experiments, monomethyl ester phthalyl monochlorides were used as reagents for the purpose of preventing the disadvantage.

i) Preparation of esters

The method of esterification was the same as in the case of phthalyl dichlorides. After the esterification, petroleum ether insoluble impurities were removed from the crude esters obtained. A good recovery of vitamin A was obtained in the purified esters except the case of using monomethyl ester (orth-) phthalyl monochloride (Tables 1 and 2). A small amount of anhydrovitamin A was also formed when using monomethyl ester phthalyl monochloride. Formation of anhydrovitamin A is due to the acidity of phthalic acid stronger than that of tere- or isophthalic acid (Table 7).

ii) Crystallization of esters

Monomethyl phthalate could not be crystallized, but both monomethyl terephthalate and monomethyl isophthalate were crystallizable. The yield of crystalline monomethyl terephthalate was higher than that of acetate from high potency vitamin A concentrate. But monomethyl terephthalate from vitamin A concentrate of lower potency could not be crystallized (Tables 3, 4 and 5).

However, the yield of crystalline monomethyl isophthalate was high even when vitamin A concentrate of lower potency was used. In crystallizability, this ester was superior to the other kinds of vitamin A esters previously prepared and was comparable with vitamin A urethanes (Table 6).

緒 言

前報においては A 濃縮物とフタル酸類のジクロリドとの反応によりエステルを製造する実験を行ない A 濃縮物より結晶性 A エステルを得るためには，フタル酸をモノクロリドとして A と反応させた方が良好な結果が得られる見込を得たので，今回はその方法について実験した結果を報告する。

* 東海区水産研究所 (Tōkai Reg. Fish. Res. Lab., Chuō-ku, Tokyo, Japan).

東海区水産研究所業績 B 第 340 号

実 験 の 部

1) 装 置

ジエステルの場合と同じである。

2) 試 薬

フタル酸，テレフタル酸，イソフタル酸（**P 酸**，**TP 酸**，**IP 酸**と略す）よりつぎのように合成したモノメチルエステル P 酸（**MP 酸**と略す），モノメチルエステル TP 酸（**MTP 酸**と略す），およびモノメチルエステル IP 酸（**MIP 酸**と略す）をモノクロリドとし使用した。その他の試薬は前と同様である。

MP 酸モノクロリド。 市販の無水フタル酸を純メタノールと反応させて製した **MP 酸**をベンゼンで再結晶後，過剰のチオニルクロリドとともに煮沸した後，減圧にてチオニルクロリドを完全に除去したものをそのまま使用した*。

MTP 酸モノクロリド。 **TP 酸**を 10% の H_2SO_4 を含むメタノールとともに煮沸してジメチルエステルとし，これを鹸化所要量の半量に相当する KOH を含むメタノールで部分鹸化後酸性とし **MTP 酸**を得た**。この **MTP 酸**をチオニルクロリドによりモノクロリドとし，石油ベンゼンで再結した結晶***を使用した。

MIP 酸モノクロリド。 **IP 酸**より **TP 酸**と同様に合成した **MIP 酸**をモノクロリドとし，石油ベンゼンに溶解後冷却し，結晶を析出させ，傾瀉にて 2～3 回精製したものを使用した****。

3) 実験方法ならびに結果

a. エステルの製造

上記のモノクロリドを A 濃縮物に対して 1.3 倍，ピリヂンをクロリドに対し 2 倍*****使用し，ヂエステ

Table 1. 同一の A 濃縮物の MP 酸，MTP 酸および MIP 酸エステルの製造比較試験
Comparative preparation of monomethyl-phthalate, -terephthalate and -isophthalate of the same vitamin A concentrate obtained from whale liver oil.

エステルの種類 Kind of ester	出発物 Starting material		粗エステル Crude ester obtained			精製エステル Purified ester			不純物 Impurity removed from crude ester		
	重量 Weight	単位 A V.A. potency 10^4 I.U./g	重量 Weight	A 単位 V.A. potency 10^4 I.U./g	A 回収率 V.A. recovery	重量 Weight	A 単位 V.A. potency 10^4 I.U./g	A 回収率 V.A. recovery	重量 Weight	A 単位 V.A. potency 10^4 I.U./g	A 回収率 V.A. recovery
	g		g		%	g		%	g		%
MP 酸エステル Monomethyl-phthalate	3.8	207	6.9	122	105	5.4	127	87	1.3	16.7**	2.8
MTP 酸エステル Monomethyl-terephthalate	3.4	204	5.8	136*	114*	4.9	146.5	104	0.9	4.7***	0.6
MIP 酸エステル Monomethyl-isophthalate	2.9	204	5.1	110*	95*	4.3	133	97	0.8	20.7****	2.8

* 固体の不純物が混入しているため，必ずしも全体を代表する値ではない。
The values may not be necessarily correct because of contamination of solid impurity.
** アンヒドロ A の吸収を示す。 Absorption curve showed the presence of anhydrovitamin A.
*** 一般吸収 General absorption.
**** A の吸収を示す。 Absorption curve showed the presence of vitamin A.

* MP 酸の収率およびモノクロリドの収量はほとんど理論量である。MP 酸の融点 81～82°C（文献値 82.5°C）。クロリドは常温で液状である。
** 少量存在する未反応の MTP 酸ヂメチルエステルは MTP 酸の K 塩の水溶液から沪別して除く。また副成する TP 酸ジ塩より再生する TP 酸は再結により分別する。
*** ジエステルの再結後収量 93%，融点 138～140°C（文献値 141～142°C），MTP 酸の再結後収量約 60%，融点 216°C（文献値約 230°C），クロリドの融点 55～56°C.
**** ヂエステルの再結後収量 96%，融点 63°C（文献値 64～65°C），MIP 酸の再結後収量約 50%，融点 189°C（文献値 193°C），クロリドは 25°C の室温で液状である。
***** 倍数の計算はジエステルの場合と同様である。

ルの場合と同様に反応させA濃縮物のモノエステルを得た。

MP 酸, **MTP 酸**, **MIP 酸**の三者の比較試験を，鯨肝油より得たA濃縮物を用いて行なつた。その結果は Table 1 に示す通りであつた。表に見るように最初に得られた粗エステルは試薬に由来する不純物を含んでいるため，まずこれを除去した。この不純物については精査しなかつたが，95% 以上可鹸化物であるので試薬から来たものと考えられる*。不純物は **MP 酸**では油状，**MTP 酸**および **MIM 酸**では白色粉末であるが，いずれも石油エーテルに溶けにくいので粗エステルを石油エーテルに加熱溶解後冷却（**MP酸**，**MTP 酸**の場合は 5°C 程度，**MIP 酸**では常温）し，不溶のまたは冷却にて析出する不純物を分離する**。なお，**MP 酸**の場合は，不純物がアンヒドロAの吸収を示すところより，ジエステルの場合と同様，**P 酸**誘導体によるエステル化ではAの一部が脱水されアンヒドロAに変ることが判る。

Table 2. 種々の原料より得たA濃縮物の MTP 酸および MIP 酸エステルの製造
Preparation of monomethyl-terephthalate and -isophthalate of vitamin A concentrate obtained from various materials.

試験番号 Test No.	エステルの種類 Kind of ester	原料の種類 Kind of material	A濃縮物試料 Original vitamin A concentrate 重量 Weight	単位 A V.A. potency 10^4 I.U./g	比 吸光 E value ratio 300mμ/325mμ	得られたエステル Ester obtained 重量 Weight	単位 A V.A. potency 10^4 I.U./g	比 吸光 E value ratio 300mμ/328mμ	Aの回収率 V. A. recovery
			g			g			%
15		カジキ肝油 Marlin liver oil	5.8	194	0.65	10.8*	99	0.63	95
16		〃	17.9	189.5	—	24.5	122.5	—	93
17		〃	17.0	199	0.61	24.1	139	0.67	99
18		カジキ蒸溜アセテイト D. A. of marlin	3.6	217	—	5.5	144	—	101
19	MTP 酸エステル	大ザメ肝油 Shalk liver oil	7.5	258	0.59	10.8	172	0.59	96
20	Monomethyl-terephthalate	クジラ肝油 Whale liver oil	22.1	171	0.72	32.8	108.5	0.73	94
21		メヌケ肝油 Roch fish liver oil	13.3	259	0.60	18.9	179	0.62	99
22		カジキアセテイト残渣 A. R. of marlin	13.5	220	0.65	19.7	143	0.64	95
23		大ザメアセテイト残渣 A. R. of shark	18.9	228	0.65	26.6	164	—	100
24		メヌケアセテイト残渣 A. R. of rock fish	14.2	220	0.59	20.0	149	0.59	96
25	MIP 酸エステル	スケソウ肝油 Pollack liver oil	10.0	174	0.63	14.3	117	—	96
26	Monomethyl-isophthalate	カジキ肝油 Marlin liver oil	7.6	174	0.73	11.2	114	0.74	97

D.A.: the distilled acetate obtained from vitamin A concentrate of liver oil.
A.R.: the residue obtained after removing crystals of vitamin A acetate as in Table 5.
* 不純物を除去しない。 includes inpurities.

不純物除去後のA回収率は **MP 酸**の場合を除き，良好でエステル化反応ではほとんどAの損失がない。そこでいろいろな原料より得たA濃縮物より **MTP 酸**および **MIP 酸**エステルを製造し，A回収率をみた。Table 2 にその結果を示す。ただしこの場合のA回収率は不純物除去後のエステルについて計算した。この

* パルミテイトの製造の際に得られる不純物はパルミチン酸無水物であることを報告したが[3]，この場合もおそらく同様なものと想像される。

** この場合アセトン，蟻酸エチルを用いると，不純物が一部溶解する上，析出した不純物中にAが含有される傾向が大である。

表より明らかなようにモノエステルの場合は，ジエステルの場合と異り，Aの損失は少なく，大体一定した回収率が得られた。吸光比をみてもモノエステルの場合は，Aがエステル化に際して変化する傾向はなかつた。

b. モノエステルの結晶化

方法。 前項において得たA濃縮物のモノエステルの結晶化を試みた。結晶化の方法はモノエステルを2倍容量の石油エーテル (b. p. 40～60°C) に溶解し，20～30°C に冷却し，析出する粗結晶を傾瀉にて分離し，さらに蟻酸エチルで 1～3 回再結する方法が最もよかつたのでそれにしたがつた。

フタル酸の種類による結晶性の比較。 Table 3 に鮪肝油より得たA濃縮物の **MP 酸**, **MTP 酸**および **MIP 酸**エステルの結晶性の比較を行なつた結果を示す。結晶するAの歩留は **MIP 酸**エステルが **MTP 酸**エステルにまさり，**MP 酸**エステルは上記の条件では結晶しなかつた。

Table 3. 同一のA濃縮物の MP 酸, MTP 酸および MIP 酸エステルの結晶性の比較
Comparative crystallization of the purified esters obtained from the same vitamin A concentrate as in Table 4.

			エステルの種類 Kind of ester		
			MP 酸エステル Monomethyl-phthalate	MTP酸エステル Monomethyl-terephthalate	MIP 酸エステル Monomethyl-isophthalate
出発 Starting material		重量 Weight g	5.4	4.9	4.3
		A単位 V.A. potency 10^4I.U./g	127	146.5	133
石油エーテル溶液より結晶析出 Crystallization from petroleum ether	粗結晶 Crude crystals	重量 Weight g	析出せず	1.3	2.6
		A単位 V.A. potency 10^4I.U./g	Noncrystallizable	157	141
		A歩留 V.A. yield %		28	64
	非結晶部 Noncrystallizable portion	重量 Weight g		3.6	1.7
		A単位 V.A. potency 10^4I.U./g	〃	141	101
		A歩留 V.A. yield %		71	30
蟻酸エチルにて再結晶 Recrystallization from ethyl formate	精製結晶 Purified crystals	重量 Weight g		0.6	1.2
		A単位 V.A. potency 10^4I.U./g	〃	174.5	193
		A歩留 V.A. yield %		14.5	40.5
	非結晶部 Noncrystallizable portion	重量 Weight g		0.7	1.4
		A単位 V.A. potency 10^4I.U./g	〃	148	105
		A歩留 V.A. yield %		14.5	25.5

原料の差異による MTP 酸および MIP 酸エステルの結晶歩留ならびにアセテイトとの比較。 つぎに色々な原料より得た **MTP 酸**および **MIP 酸**エステルの結晶の歩留をみるため，前項 Table 2 に載せたエステルの総てについて結晶化を試みた。

Table 4 にはその内結晶の得られたものだけについての結果を示した。また Table 5 には比較のため同一の原料より別途に得たA濃縮物アセテイトの結果を示す*。

この二表の結果を比較すると，メヌケ肝油を原料としたA濃度の高いA濃縮物では **MTP 酸**エステル (No. 21) の方がアセテイト (No. 29) よりも結晶歩留がはるかに高く，かつ結晶の純度も良好であつた。またA濃度のやや低い大ザメ肝油より得たものでは **MTP 酸**エステル (No. 19) とアセテイト (No. 28) の結

* ただし同一原料のものでも出発A濃縮物の精製の程度はそれぞれ異つている。すなわちMIP酸エステルは脱ステロール，ウレア処理，溶剤分別の各操作を経て精製したA濃縮物より得たものであるし，MTP 酸エステルはさらに吸着処理による精製を行なつたA濃縮物より得た。またアセテイトは吸着処理までの精製を行なつたA濃縮物をアセチル化し，分子蒸留によりさらに精製したものである。

Table 4. 種々の原料より得た A 濃縮物の MTP 酸および MIP 酸エステルの結晶化
Crystallization of the purified esters obtained from various materials as in Table 5.

エステルの種類 Kind of ester	使用したエステル Ester used			粗結晶 Crude crystal			精製結晶 Purified crystal		
	種類* Kind	重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	A歩留 V. A. yield %	重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	A歩留 V. A. yield %
MTP酸エステル	No.19	10.8	172	3.9	170	36	1.8	196	19
	21	18.9	179	11.1	197	65	9.4	207	58
Monomethyl-terephthalate	18	5.5	144	1.8	154	35	0.4	189	9.6
	23	26.6	164	8.5	175	34	1.6	196	7.2
MIP 酸エステル Monomethyl-isophthalate	25	14.3	117	6.5	152.5	60	3.2	197	38**
	26	11.2	114	5.2	146	60	2.6	194	35

* 第2表の番号を示す。 Represented by the test number in Table 5.

** 結晶を除去した沪液を合せ，再び冷却し粗結晶を得，再結して精製結晶を得た。これを計算に入れると 45% となる。
Crystals were also recovered from the filtrates in the first and the second crystallization. If they are combined, the yield reaches 45%.

Table 5. 種々の原料より得た A 濃縮物アセテイトの結晶化
Crystallization of acetate of vitamin A concentrate obtained from various materials.

試験番号 Test No.	原料の種類 Kind of material	A濃縮物試料 Vitamin A concentrate used		得られたアセテイト Acetate obtained			精製結晶 Purified crytsals obtained		
		重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	A回収率 V. A. recovery %	重量 Weight g	A単位 V. A. potency 10^4 I.U./g	A歩留 V. A. yield %
27	カジキ肝油 Marlin liver oil	53.7	191	56.5	161.5	89	5.5	248	13.3
28	大ザメ肝油 Shark liver oil	43.5	217	48.9	196.5	102	7.5	256.5	24
29	メヌケ肝油 Roch fish liver oil	52.75	244	58 9	217	99.1	17.5	253	34.5

晶歩留はほぼ同様となり，さらに A 濃縮物の A 濃度が低くなると **MTP 酸**エステルの結晶は析出しなくなる。すなわちカヂキ肝油を原料とした A 濃縮物では **MTP 酸**エステル (No. 15, 16, 17) が結晶しないのにアセテイト (No. 27) は結晶した。ただし前述のように原料の精製程度がアセテイトの方がよいので一旦カジキより得た A 濃縮物をアセテイトとし蒸留し，さらに鹸化して回収し，再び **MTP 酸**エステルとしたもの (No. 18) につき試験したところ結晶化した。またアセテイトの結晶を完全に除去し，もはやアセテイト結晶が析出しないような残渣を鹸化し得た A 濃縮物の **MTP 酸**エステル (No. 22, 23, 24) の場合にも，1例ではあるが結晶が得られた。

以上の実験の結果によれば，A 濃度の高い A 濃縮物は **MTP 酸**エステルにすることにより，アセテイトとするよりもはるかに高い歩留で結晶化することができる。しかし A 濃度の低い原料では，**MTP 酸**エステルとする前に，少なくともアセテイトと同程度の精製を行う必要があろう。

また **MIP 酸**エステル (No. 26) は，**MTP 酸**エステルやアセテイトとしては結晶化することのできないような，精製度の劣る A 濃縮物を原料とした場合でも非常に良好な歩留で結晶となつた。

さらに濃縮および結晶化が非常に困難な，スケソウ肝油よりの A 濃縮物も **MIP 酸**エステルとすることに

より好収率で結晶化することができた。

他のエステルおよびウレタンとの比較。 つぎに結晶の歩留を従来得られた結晶性エステルおよびウレタンの場合を比較してみよう。Table 6 に示したのは諸研究者によつて発表された各種 A エステルの結晶歩留である。用いられた A 試料の種類および純度が異るので厳密な比較は困難であるが，合成 A 試料は天然 A 試料よりも結晶の収率は良好であること，A 試料の純度が低くなるにつれ結晶歩留は急激に減少すること（特にアセテイト，パルミテイト，サクシネイト等にいちじるしい）などの事実を考慮してこの表を見れば，**MTP 酸**エステルの歩留は他のナフトエイト，*p*-フェニルアゾベンゾエイト等よりは良好であり，**MIP 酸**エステルの歩留は他のエステルよりもよく，ウレタンの結晶歩留に匹敵すると考えられる。

Table 6. 従来得られた結晶性 A エステルおよび A ウレタンの収率
Yield of crystalline vitamin A esters and urethanes obtained on previous occasions.

研究者 Investigator	Baxter[1] et al.	Isler[2] et al.		Mead[3] et al.	阿河等 Akawa et al.[4,5]			著者 Present author
使用したA試料 Vitamin A used	天然結晶A アルコール Natural crystalline vitamin A alcohol	合成 A Synthetic vitamin A		天然 A濃縮物 Natural vitamin A concentrate	天然 A濃縮物 Natural vitamin A concentrate		合成 A Synthetic vitamin A	天然 A濃縮物 Natural vitamin A concentrate
A 試料の純度 % Purity of vitamin A (A単位 V·A potency 10^4I.U./g)	100	50	60	87	52 (170)	72 (237)	91 (300)	53 (174)
結晶収量 Yield of crystals to theoretical (%) Palmitate	48							
Anthraquinone-β-carboxylate		44*						37
p-Phenylazo-benzoate			16					
β-Naphthoate	58	37*		3.3				
Acetate	75							
Succinate	46							
β-Naphthylurethane					41–50*	72*	79*	
Biphenylurethane					43–57*			
Phenylazophenyl urethane					26*			

* 粗結晶の収量 Yield of crude crystals.

考　　察

本実験においては，前報で予想したように，フタル酸類の一方の酸基をあらかじめ適当なアルコールと結合させた後モノクロリドとし A 濃縮物と反応させてエステルとする方法が，エステル化に際し A の損失をなくし，しかもエステルの結晶化を容易にすることを示した。しかしながらこの方法でも **MTP 酸**，**MIP 酸**のエステルと異り **MP 酸**エステルはエステル化の際の A 回収率も悪く，結晶にもならなかつた。この理由としては色々のことが考えられるが，**MP 酸**エステルの場合に A がアンヒドロ A に変ることも原因の 1 つである。前報において **P 酸**エステルの場合にもアンヒドロ A が生成することをみとめたから，アンヒドロの生成は **MP 酸**または **P 酸**を酸クロリドとして A と反応させたときにみられる特有な現象のように思われる。

そこでまず一般に A と酸クロリドを反応させた時，アンヒドロ A の生成するのは何故か，そしてオルト

配置をとる **MP 酸**あるいは **P 酸**とメタあるいはパラ配置の，他のフタル酸類との構造上の差異がこれと関連があるかどうかについて考えてみた。

著者の経験によれば，この場合 A がアンヒドロ A に変る時と変らぬ時がある。すなわちアセチルクロリド，パルミチルクロリド等と A とを反応させた場合にはアンヒドロ A は生成しない[6] がニトロ安息香酸クロリド等の場合は A はほとんどアンヒドロ A に変る。また従来の研究により A が脱水されてアンヒドロ A になる反応は HCl のような酸の存在により促進されることは知られているが，A が酸クロリドと反応してエステルとなる反応においても，酸の酸性が強いと A がアンヒドロ A となるのではないかと想像される。そこで酸クロリドとして A と反応させたことのある酸の中から文献により解離定数の判つているものをぬきだし，アンヒドロ A の生成の有無との関係を見た。Table 7 に示したのがこの関係であるが，解離定数が 1.0×10^{-3} 以上の酸を酸クロリドとして A と反応させた時には例外なくアンヒドロ A を生成していることが判つた。たとえば酢酸，安息香酸をクロリドとし A と反応させてもアンヒドロ A が生成しないのに，モノクロル酢酸，ジニトロ安息香酸のクロリドを用いると，ほとんど A がアンヒドロ A に変ることは Cl 基，NO_2 基の導入により酸の解離定数がいちじるしく増大することにより説明できるであろう。フタル酸類の場合においてもオルト位置に酸基が存在することは，メタおよびパラ位置に存在する場合よりも解離定数は大となることは一般に認められている事実であるし，実際の解離定数の大さも表に示すとおりであるから **P 酸**および **MP 酸**の場合のみ，アンヒドロ A が生成してもよいように思われる。

Table 7. 酸の解離定数とアンヒドロ A 生成の関係
Relation between the dissociation constant of acid and formation of anhydrovitamin A in esterification.

酸の種類 Kind of acid	温度 Temp. °C	解離定数 Dissociation constant	アンヒドロ A 生成の有無 Formation of anhydrovitamin A
酢酸 Acetic acid	25	0.0175×10^{-3}	−
モノクロル酢酸 Monochloracetic	25	1.4×10^{-3}	+
安息香酸 Benzoic	25	0.0631×10^{-3}	−
3-5-ジニトロ安息香酸 3-5-Dinitrobenzoic	25	1.51×10^{-3}	+
リン酸 Phosphoric	25	7.52×10^{-3}	+
コハク酸 Succinic	25	0.087×10^{-3}*	−
β-ナフタリン酸 β-Naphthoic	25	0.068×10^{-3}	−
P 酸 Phthalic (ortho)	25	1.0×10^{-3}*	+
TP 酸 Terephthalic (para)	18	0.29×10^{-3}*	−
IP 酸 Isophthalic (meta)	16	0.31×10^{-3}*	−

* Dissociation constant for dibasic acid is for the first hydrogen.
2 塩基性酸は第 1 解離定数を示した。

摘　　要

モノメチルエステルフタル酸類のモノクロリドによる A 濃縮物エステルの製造実験を行ないつぎの結果を得た。

1) エステル化における A 回収率は良好で，一定した値が得られた。

2) モノメチルエステルフタル酸（**MP 酸**）エステルの製造時に A がアンヒドロ A に変化することが認められた。

3) 得られたエステルは **MP 酸**の場合を除き結晶化し得た。この場合，モノメチルエステルイソフタル酸（**MIP 酸**）エステルはモノメチルエステルテレフタル酸（**MTP 酸**）エステルより結晶性がすぐれていた。

4) **MTP 酸**エステルの結晶性は A 濃度の高い A 濃縮物を試料とした場合，アセテイトよりまさつている。

5) **MIP 酸**エステルの結晶性は精製程度の低い A 濃縮物を試料とした場合でも，従来得られたアセテイトおよび他のエステルにまさり，A ウレタンに匹敵する。

文　　献

1) J. G. Baxter and C. D. Robeson: J. Amer. Chem. Soc., **64**, 2408～2410 (1942).
2) O. Isler, W. Huber, A. Ronco u. M. Kofler: Helv. Chim. Acta, **30**, 1911 (1947).
3) T. H. Mead, S. W. F. Underhill and K. H. Coward: Biochem, J. **33**, 589 (1939).
4) 阿河利男・江幡泰行・小森三郎: 工化, **58**, 106 (1955).
5) 阿河利男・塩見卓司・小森三郎: 工化, **59**, 1040 (1956).
6) 衣巻豊輔: 日水誌, **20**, 1027～1034 (1955).

天然ビタミン油よりビタミンA濃縮物を経済的に製造する方法の研究—XIII.

ビタミンA濃縮物のエステル化 (其の5)
フタル酸類のモノビタミンAエステルの性状

衣 巻 豊 輔

(1960 年 11 月 24 日受理)

STUDIES ON THE ECONOMICAL MANUFACTURE OF VITAMIN A CONCENTRATE FROM FISH LIVER OIL—XIII.

ESTERIFICATION OF VITAMIN A CONCENTRATE
5. PROPERTIES OF MONOVITAMIN A ESTERS OF PHTHALIC ACIDS

Toyosuke KINUMAKI*

As described in the former paper (Series XII), the author obtained crystalline vitamin A ester of monomethyl ester phthalic acids from vitamin A concentrates.

In this work, properties of the esters were examined.

i) Physical and chemical properties of esters

Photos of purified specimens of monomethyl terephthalate and monomethyl isophthalate are shown in Figs. 1 and 3. Their properties such as melting point, ultra violet absorption, saponification value and solubility are in Table 1 and Figs. 2 and 4. The data show that these two esters are monovitamin A monomethyl terephthalate and monovitamin A monomethyl isophthalate respectively.

ii) Cis- trans isomerism of esters

The result by the reaction of vitamin A alcohol obtained from these two esters with maleic anhydride, revealed that the vitamin A composing these esters is all-trans form. See Fig. 5.

iii) Stability of esters

As indicated in Fig. 6, stability of crystalline vitamin A monomethyl terephthalate in oil solution was the same as that of vitamin A acetate. Stability of monomethyl isophthalate was also in the same order.

In Table 2, stability of these esters in the form of crystals is shown. Crystalline vitamin A monomethyl isophthalate was found better in stability than crystalline vitamin A urethanes which are well known as fairly stable vitamin A derivatives (Table 3).

iv) Crystals of m. p. 97～98°C from vitamin A monomethyl terephthalate

The auther obtained crystals which melt at 97～98°C, from monomethyl terephthalate of vitamin A concentrate left standing for a long time in ethyl formate. These crystals were different from vitamin A monomethyl terephthalate and could also be detected in crystalline vitamin A monomethyl terephthalate stored for weeks. Analytical data of these crystals were: acid value 0.3, saponification value 346 and nonsaponifiables ca. 60%. The spectrophtometric curve is shown in Fig. 7, but the structure of these crystals could not be determined.

緒 言

前報においてA濃縮物よりモノメチルエステルテレフタル酸 (**MTP 酸**) およびイソフタル酸 (**MIP 酸**)

* 東海区水産研究所 (Tōkai Reg. Fish. Res. Lab., Chuō-ku, Tokyo, Japan).

東海区水産研究所業績 B 第 341 号

のエステルを結晶として得たが，本報においては，このエステルの性状につき報告する。

実 験 の 部

1) 結晶の一般性状

A 濃縮物の **MTP 酸**エステルより得た精製結晶は，微細な黄色結晶であるが，これを蟻酸エチルで 1～2 回再結すると Fig. 1 に示すような淡黄色の針状結晶となる。更に注意して再結をかさねると無色になるが融点その他の特数は薄黄色のものと変らない。その性状は Table 1 および Fig. 2 に示す通りで，合成 A から得た **MTP 酸**エステルと混融して融点降下をみとめなかつた。したがつて，この結晶は Monovitamin A monomethyl terephthalate であると認められる。純結晶は結晶性に富み 5°C 程度で蟻酸エチル溶液より析出し，10 万単位程度のサラダ油溶液としても室温の低い時には結晶が析出する。

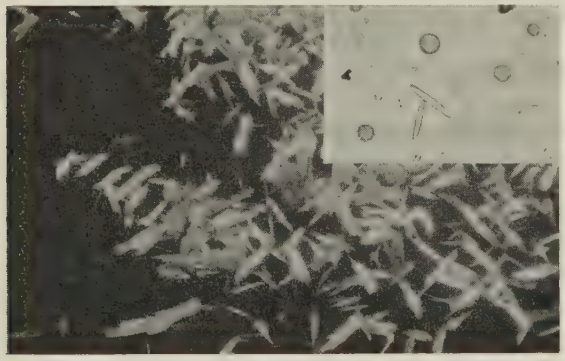


Fig. 1. A の MTP 酸エステルの結晶（蟻酸エチルより再結）偏光顕微鏡写真．右上に示したのは普通顕微鏡写真による拡大図。

Crystalline monovianmin A monomethyl terepethalate (Recrystallized from ethyl formate)

Polarization photomicrograph. Upper right: Usual photomicrograph, slightly enlarged.

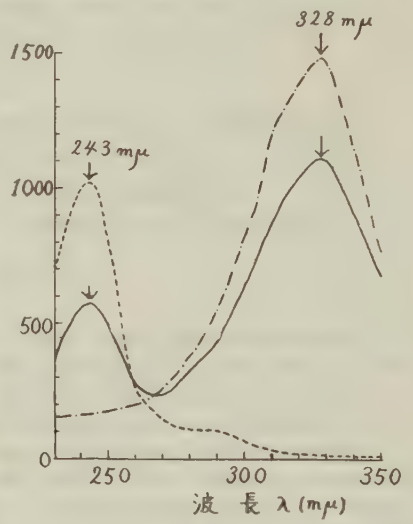


Fig. 2. A の MTP 酸エステル結晶 ——，A アセテイト -·-·- および MTP 酸 ····，の紫外部吸収曲線（イソプロパノール溶液）

Ultra violet absorption curves of crystalline monovitamin A monomethyl terephthalate ——, vitamin A acetate -·-·-, and monomethyl ester terephthalic acid ····, in isopropanol.

Table 1. A 濃縮物より得た MTP 酸および MIP 酸エステルの性状
Properties of crystalline monomethyl-terephthalate and isophthalate obtained from vitamin A concentrate.

エステルの種類 Kind of ester	融 点 m. p. °C	紫外部吸収極大（イソプロ溶液） λ_{max}. of U.V. absorption (in isopropanol)	$E^{1\%}_{1cm}$ 値 (328 mμ) 実側 Found	$E^{1\%}_{1cm}$ 値 (328 mμ) 計算* Calcd.	鹸化価 Sap. value 実測 Found	鹸化価 Sap. value 計算** Calcd.	溶解性 Solubility
MTP 酸エステル Monomethyl-terephthalate	72～74	328mμ 243mμ	1103	1118	250	250.2	メタノール，エタノールに難溶，熱イソプロ可溶ベンゼン，石油エーテル，エーテルに可溶 Spar. sol. in MeOH and EtOH, sol. in hot isopropanol, sol. in benzene, pet. ether and ether.
MIP 酸エステル Monomethyl-isophthalate	105～106	328mμ	1111	1118	250	250.2	同上 same as above.

* Calculated from $E^{1\%}_{1cm}$ 325 mμ = 1750 for vitamin A alcohol.

** Calculated as monovitamin A monomethyl ester.

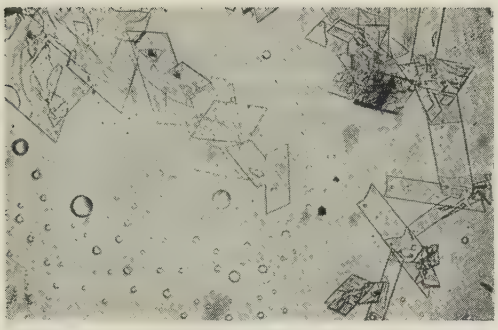


Fig. 3. A の MIP 酸エステルの結晶 (蟻酸エテルより再結)
Crystalline monovitamin A monomethyl isophthalate (Recrystallized from ethyl formate).

MIP 酸エステルも同様に蟻酸エテルで1～2回再結すると Fig. 3 に示すような薄片状の比較的大きな結晶となる。この結晶は **MTP 酸**エステルの結晶よりもさらに結晶性に富み，室温で蟻酸エチル溶液およびサラダ油溶液より容易に析出する。その性状は Table 1 および Fig. 4 に示すごとくであり，Monovitamin A monomethyl isophthalate と考えられる。

2) 結晶を構成する A の立体異性

従来の報告によれば天然ビタミン油中にはトランス型の A のほかにシス型 A が含まれていることが知られているが，著者の得たAエステルを構成するAが，いかなる立体構造を有しているかを確めてみた。

MTP 酸および **MIP 酸**エステルの結晶をそれぞれイソプロパノールに加熱溶解し，メタノール性 KOH 溶液を加え鹸化し，遊離の A アルコールを得た。このAアルコールを P. A. PLACK の方法[1] にならつて無水マレイン酸と反応させ Fig. 5 に示す結果を得た。これより明らかなごとく，いずれも短時間で無水マレイン酸と反応し，ほとんど残存Aはみとめられなくなる。したがつてAの **MTP 酸**および **MIP 酸**エステル結晶は all-trans 型 A のみよりなると考えられる。

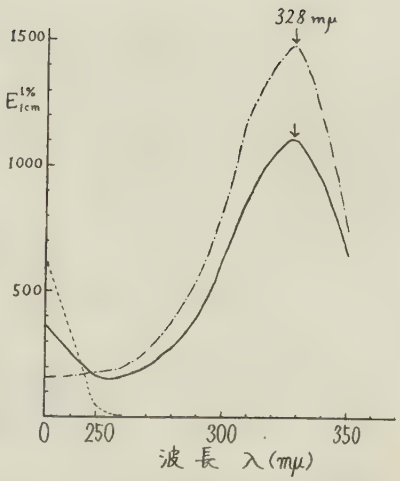


Fig. 4. A の MIP 酸エステル結晶 ——, A アセテイト -·-·- および MIP 酸 ····, の紫外部吸収曲線 (イソプロパノール溶液)
Ultra violet absorption curves of crystalline monovitamin A monomethyl isophthalate ——, vitamin A acetate -·-·-, and monomethyl ester isophthalic acid ····, in isopropanol.

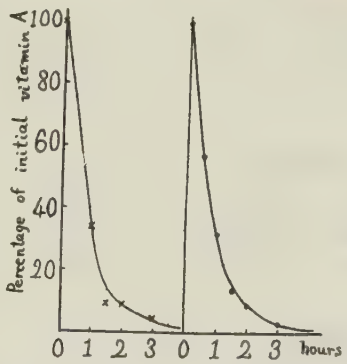
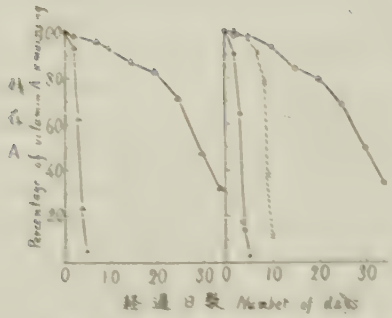


Fig. 5. A の MTP 酸エステル結晶 (左) および MIP 酸エステル (右) より得たAアルコールと無水マレイン酸との反応 (25°C)
Reaction of vitamin A alcohol from crystalline monomethyl terephthalate (left) and from crystalline monomethyl isophthalate (right) with maleic anhydride in benzene at 25°C.

3) 結晶の安定性

油溶液としての安定性。 **MTP 酸**エステルおよびアセテイトの結晶を 10 万単位のサラダ油溶液とし，先に報告した方法[2] にしたがつて安定性を試験した。その結果，Fig. 6 に示すように **MTP 酸**エステルの安定性は，アセテイトと全く同じであつた。また 12 万単位のメヌケ肝油を同時に試験したが，サステンを 0.25% 程度加えた **MTP 酸**エステル油溶液の安定性は肝油よりすぐれていた。



—▲— Solution of crystalline monovitamin A monomethyl ester terephthalate in salad oil (100,000 I.U./g)
—△— 〃 +0.25% of B. H. A.
—•— Solution of crystalline vitamin A acetate in salad oil (100,000 I.U./g)
—○— 〃 +0.25% of B. H. A.
···×··· Reckfish liver oil.

Fig. 6. A の MTP 酸エステル結晶および A アセテート結晶のサラダ油溶液および A [illegible]
Stability of crystalline monovitamin A terephthalate and vitamin A acetate in salad oil, and vitamin A in rockfish liver oil.

Table 2. A の MTP 酸エステル，MIP 酸エステルおよびアセテート結晶の安定性 (30°C)
Stability (percentage of initial potency) of crystallinevitamin A monomethyl-terepithalate, monomethyl isophthalate and acetate exposed to air at 30°C

Kind of crystalline ester		MTP 酸エステル Monomethyl-terephthalate	MIP 酸エステル Monomethyl-isophthalate	Acetate	
結晶の大きさ Size of crystal (average diameter)		0.5 mm	0.8 mm	2.3 mm	0.8 mm
経過日数 Time in days	1	99%	100%	100%	92%
	3	53 〃	92 〃	88 〃	73 〃
	7	42 〃	98 〃	91 〃	65 〃
	13	31 〃	93 〃	88 〃	68 〃

また MIP 酸エステルの結晶についても 1 万単位*のサラダ油溶液とで試験したが，MTP 酸エステルの場[illegible]

結晶のままでの安定性。 結晶の状態での安定性をしらべるため，試料 0.1g を内径 12mm の小皿にとり 30°C の恒温器中に放置し安定性をしらべた。この場合，結晶の大きさが安定性に関係するので対照としてA アセテートの結晶の中程度のもの，比較的小なるものを同時に試験した。その結果，Table 2 によると MIP 酸[illegible]

比較してる。BAXTER 等[3] および MEAD 等[4] により，β-ナフトエイト，パルミテイト，サクシネイト，β-

Table 3. A [illegible] 30°C
Stability (percentage of initial potency) of crystalline vitamin A urethanes exposed to air at 30°C. (By AKAWA et al.)

Kind of crystalline urethane		β Naphthyl urethane	Biphenyl urethane
経過日数 Time in days	1	85	86
	3	80	88
	6	64	60

性はアセテートと同程度かそれよりもあることが報告されているから MIP 酸エステルは[illegible]の結晶のそれよりも安定である。

[illegible] A [illegible]
と考え，Table 3 に氏等の結果を示した。こ[illegible]

* 10 万単位にすると 30°C では結晶が析出するため 1 万単位の溶液とした。

より **MIP 酸**エステルの安定性はウレタンと比較しても劣らぬように思われる。

4) 長期間放置した A の MTP 酸エステルより生ずる融点 97～98°C の結晶

Aの **MTP 酸**の結晶（融点: 71～73°C, A単位: 196 万）を数週間 −20°C に放置した*。A単位が低下したので蟻酸エチルで再結したところ溶けにくい固体が存在したのでこれを採取し石油エーテルで数回再結したところ融点 97～98°C, A単位 165 万の結晶が得られた。さらに再結を繰りかえしても融点および単位は上昇しない。また溶剤に対してもAの **MTP 酸**エステルより溶けにくく，精製した結晶は石油エーテルより室温で容易に析出する。一方蟻酸エチルに溶けた部分からはAの **MTP 酸**エステルが得られた。したがつてこの結晶はAの **MTP 酸**エステルが変化して生じたものと考えられる。紫外部吸収曲線は Fig. 7 のとおりで，Aおよび **MTP 酸**あるいは **TP 酸**が主要部を占めていることは明らかである。著者はこの結晶はAの **MTP 酸**エステルとその分解によつて生じた遊離の **MTP 酸**（あるいは **TP 酸**）が混晶を作つたものではないかと考えたが，Aの **MTP 酸**エステルと **MTP 酸**あるいは **TP 酸**を用いて混晶が生成するかどうかをみたところ，混晶はできなかつた。またこの結晶の特数を測定したが，酸価: 0.3，鹸化価: 346 で遊離の **MTP 酸**が存在することは考えられない。不鹸化物含量は試料が少ないため正確ではないが，3回の測定により約 60% であつた。

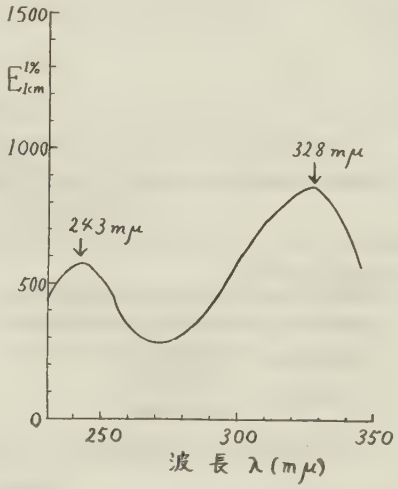


Fig. 7. 融点 97～98°C の結晶の紫外部吸収曲線（イソプロパノール溶液）
Ultra violet absorption curve of the crystals which melt at 97～98°C in isoproponol.

一方，前報において述べたようにA濃縮物のアセテイトよりアセテイトの結晶を除いた残渣を試料として **MTP 酸**エステルを製造したが，カジキ肝油より得たものではAの **MTP 酸**エステルの結晶は得られなかつた。そこでこのエステル 19.9g を蟻酸エチルに溶解し，ドライアイス中で長期間放置したところ沈殿が析出した。蟻酸エチルで数回再結することにより菊花状の結晶 0.5g を得た。融点 95～97°C, A単位 164.5 万で前記の結晶と同一物と考えられる。したがつてこの場合もAの **MTP 酸**エステルがこのものに変化し，溶剤に溶けにくくなるため析出して来たのであろう。

考　　察

著者は実験をはじめるにあたつて，Aのフタル酸類のエステルにおいても，従来知られているようにその融点はパラ位置の異性体のエステルの方がメタ，オルト位置の異性体のエステルよりも高いと予想したが，実験の結果によるとAの **MTP 酸**エステル（パラ位置）の融点よりも **MIP 酸**エステル（メタ位置）の方がかえつて高かつた。これは一見奇異に感じられるのでこれにつき考察してみた。

従来ベンゼン核に2コの置換基がパラ位置にある異性体がメタ位置にある異性体より融点が高いといわれているのは，2つの置換基の大きさがほぼ同じと考えられる場合にのみ成立するものとすれば，Aのフタル酸類エステルのように一方の酸基が分子量の小さいメタノールと結合し，他方の酸基が分子量の非常に大きいAと結合している場合はこれとは異なる融点関係が成立してもよいと思われる。もしそうであるならばAエステル以外のベンゼン核に2つの置換基を有する化合物にあつても，Aのフタル酸類エステルと同じようなパラ，メタ位置の異性体の間の融点逆転の関係がみられるはずである。そこでモノニトロ安息香酸を例としてみると，酸の融点は NO_2 基と COOH 基とがパラ位置にあるもの（m. p. 238°C）はメタ位置のもの

* この時真空中に封ずるとか，不活性ガスを充塡することなどの処置は行なわなかつた。

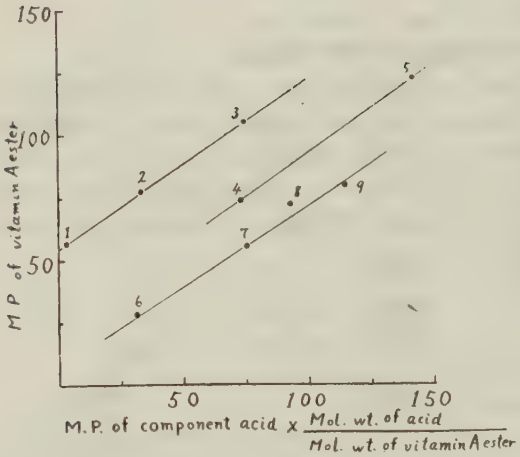
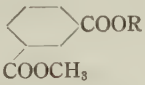
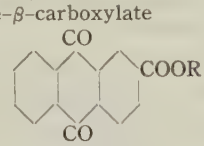
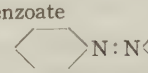


Fig. 8. A エステルの融点とエステルを構成する酸の融点との関係

Relation between the melting point of vitamin A ester and that of component acids.

1. Acetate CH_3COOR
2. Succinate CH_2COOR / CH_2COOR
3. Monomethyl isophthalate 
4. β-Naphthoate
5. Anthraquinone-β-carboxylate 
6. Palmitate $CH_3\cdot[CH_2]_{13}COOR$
7. Terephthalate $ROOC$ $COOR$
8. Monomethyl terephthalate H_3COOC $COOR$
9. p-Phenylazobenzoate  $COOR$

R = Vitamin A residue

(m.p. 140～141°C) より高く，メチル，エチル等のエステルにおいてもこの関係は変らず，従来知られた法則どうりである。しかし 2·4-ジニトロフェニールエステルの場合は，パラ位置のもの (m.p. 139～140°C) よりメタ位置のもの (m.p. 160°C) の方が却つて融点が高くなる。またトルイル酸，クロル安息香酸，アミノ安息香酸等のエステルにおいても結合するアルコールの分子が大となるにしたがい，パラ位置のものとメタ位置のものの融点は逆転こそしないが非常に差が少なくなつてくる。このようにベンゼン核に 2 つの置換基を有する酸では酸に結合するアルコールの分子が大きくなるとエステル融点はもとの酸の構造よりは分子全体の構造により支配されるようになり時として融点の逆転も起ると考えられる。

以上の考えよりすれば，Aのフタル酸類エステルにかぎらず他の酸のエステルにおいても，もとの酸の融点とその酸とAとのエステルの融点の関係を求めてみたら，エステル分子の構造の差異との間に関連性が見出されるのではないかと考えた。Fig. 8 に示すのがこれであるが，この際エステルを構成する酸の分子がアルコール（ここではA）に比しはなはだしく小さい時はそのエステルは酸よりもアルコールの性質に近く，この逆の場合は酸に近くなると考えられるから*，それを補正するため酸の融点にエステル中における酸の占める割合を表わす数値を乗じたものを酸の融点のかわりに用いた。この図によれば，Aのエステルは融点よりみて 3 つの系列に分けられるようである。これを下から 1, 2, 3 系列とすると，各系列に属するエステルはその間に共通した特徴が認められる。すなわち 1 系列に属するエステルは細かな針状時に片状に結晶し，分子の構造はどれも直線状に長い形をしている。2 系列のエステルはナフタレン核，アントラキノン核のような芳香族が横にならんだ構造を有し，結晶は細かな薄片状である。3 系列のエステルは一般に大きなプリズム状に結晶するが，その構造は 1 系列のものにくらべると酸の分子がAとのエステル結合の附近に小さくまとまつた構造を有している。これに属するエステルのもう 1 つの特徴は，その構成酸のクロリドまたはメチルエステルの融点が低いことで，これは他の系列の構成酸の場合といちぢるしく異る点である。

* たとえばコレステリンアセテイトは酢酸よりコレステリンに類似し，オレイン酸メチルはメタノールよりオレイン酸に類似する。

このように分類すると従来報告された非結晶性のAエステルすなわちステアレイト，オレエイト，ブチレイト，ベンゾエイト等は皆，酸の融点が低く，構造上も第1系列に属すので，エステルの融点も低く，そのため結晶しがたくなるのであろう。

このことは今後融点高きAのエステルを製造する必要が生じた場合には，酸の融点の大きさのみならず構造も考慮する必要があることを示している。もちろん前報において述べたごとくその酸はAとの反応にあたつてアンヒドロAを生成するものであつてはならないことは当然である。たとえばヂニトロ安息香酸は酸の融点および構造上よりは融点の高いAエステルを生成する条件をそなえていると考えられるが，解離定数が高いため実際にはAがアンヒドロAになり，Aエステルとすることは非常に困難である。

摘　　要

A濃縮物より得たモノメチルエステルテレフタル酸（**MTP 酸**）およびモノメチルエステルイソフタル酸（**MIP 酸**）のエステルの性状を調べた結果はつぎのようであつた。

1) 結晶の特数および紫外部吸収曲線の測定の結果，この結晶はそれぞれ Monovitamin A monomethyl terephthalate および Monovitamin A monomethyl isophthalate であつた。
2) エステルの結晶を構成する A は all-trans 型であつた。
3) 結晶の酸化に対する安定性は油溶液とした時はアセテイトと同様であるが，結晶のままでは非常に安定で，特に **MIP 酸**エステルの安定性は A ウレタンの安定性よりもすぐれていた。
4) 長期間放置した **MTP 酸**エステル結晶より生ずる融点 97～98°C の結晶の性状をしらべたが，本体は不明であつた。

本研究に当り，顕微鏡写真製作に御助力下さつた山田，高野両技官に深謝いたします。

文　　献

1) P. A. PLACK: Biochem. J. **64**, 56～63 (1956).
2) 衣巻豊輔・田部井菊子: 日水誌, **20**, 539～550 (1954).
3) J. G. BAXTER and C. D. ROBESON: J. Amer. Chem. Soc., **64**, 2408～2410 (1942).
4) T. H. MEAD, S. W. F. UNDERHILL and K. H. COWARD: Biochem. J., **33**, 589 (1939).
5) 阿河利男・横井繁雄・小森三郎: 工化, **58**, 686 (1955).

$SbCl_3$–$CHCl_3$ 試薬によるコレステロールの発色の吟味

平尾秀一・菊池嶺

日本水産学会誌
第二十七巻 第七号 別冊
昭和三十六年七月二十五日発行

Reprinted from Bulletin of
the Japanese Society of Scientific Fisheries
Vol. 27, No. 7, July 1961

$SbCl_3$–$CHCl_3$ 試薬によるコレステロールの発色の吟味

平尾秀一・菊地 嶺

(1961 年 3 月 20 日受理)

COLORATION OF CHOLESTEROL WITH $SbCl_3$–$CHCl_3$ REAGENT

Shuichi Hirao and Ryô Kikuchi*

By the use of chromatographically purified cholesterol, the coloration developed by $SbCl_3$–$CHCl_3$ reagent was studied. As shown in Table 1, the larger the amount of cholesterol present, the deeper becomes the pink color, the more adds an orange shade and the quicker in its development. As is shown in Fig. 1, the absorption maxima of the reaction product are found at 423 and 500 mμ. The *E* values calculated from each of the maximum differ depending on the reaction time of the observation, and on the amount of cholesterol used. As is shown in Fig. 2, when cholesterol is 70 micrograms per m*l*. of the reagent, the increase of absorption at both 423 and 500 mμ shows even after about 5 hours. In the case of 200 micrograms, however, the absorption at 500 mμ increases much faster than that at 423 mμ, and in contrast with the apsorption at 423 mμ that reaches an approximate constant after changing its position into 408 mμ via 415 mμ. When a color solution, the development of which is still increasing, is diluted with another aliquote of reagent, the apsorption at 423 mμ decreases in proportion to the quantity of newly added reagent, while the 500 mμ maximum does not (Fig. 3). On the contrary, a color solution, when the development of which has ceased to increase, the color is diluted in proportion to the quantity of newly added reagent.

The reaction products of cholesterol with the reagent were recovered by treating the colored solution with KOH and ether, and chromatographically separated into several fractions (Table 2 and Fig. 5).

On the basis of the data, the process of the color development of cholesterol can be traced as follows: Cholesterol → a substance with a maximum at 235 mμ → a substance with maxima at 265, 275 and 287 mμ → a substance with maxima at 292, 305 and 320 mμ.

緒 言

コレステロール (以下 Chl と略す) は $SbCl_3$–$CHCl_3$ 試薬 (Nield 試薬) によつて発色することは古くから知られており[1], 最近沼田[2], 藤田, 森元[3] らは Chl 量と呈色の強さとの関係を調べ, 三輪[4] は Nield 試薬をも含めた種々の試薬における Chl の呈色を検討している。しかし氏らはビタミン D の定量に関連して以上の検討をおこなつたものであるから, Chl の呈色の吟味としては, やや部分的なるを免れない。著者らは肝油不ケン化物のステロール類およびその他の未知成分の検討をおこなうために, Chl の呈色を更に吟味しておくことが必要と考えたので本実験をおこなつた。

実 験 材 料

Chl カタクチイワシの皮からエーテルで油を抽出し, 常法によりケン化し, 得た不ケン化物を MeOH に溶解して冷し, 析出した粗 Chl を更に数回 MeOH で再結した後アルミナクロマトグラフによる精製をおこない, m. p. 149.2°C (uncorrect) のものを得てこれを本実験に使用した。Fieser[5] によると酢酸より

* 東海区水産研究所 (Tokai Res. Fish. Res. Lab. Tsukishima, Tokyo).
東海区水産研究所業績 B 356.

再結した最純 Chl は m.p. 149.5～150.0°C (真空キャピラリー中) とされている。著者らの試料は m.p. においてこれに近く，紫外部の吸光もごく低いので，ほぼ純粋な Chl と考える。なおクロマトグラフの他の画区からはやや性状の異なる数種のステロールが少量ずつ分離されたがこれについては別報にのべる予定である。

また，別途に牛脂を同様処理して得た Chl についても実験をおこなつたが，カタクチイワシの Chl と同じ結果を得たので以下はカタクチイワシの Chl についての実験の結果をのべる。

$SbCl_3$-$CHCl_3$ 試薬　ビタミン A・D の比色に用いるものと同様のもので，$SbCl_3$ の $CHCl_3$ 飽和溶液。本実験には添加剤として塩化アセチルを用いず，無水酢酸を 1% 添加した。

反応温度　25°C でおこなつた。

結　　果

1) Chl の量および発色時間と色調との関係　Chl の発色は Chl の量，時間，温度などによつて呈色の状態が非常に異なる。概していえば，Chl の量がごく少ない時には発色までに長時間を要し，かつその色はうすいピンク色であり，Chl の量が多量の時は発色が早く色調が濃く，かつ橙色を呈する。また呈色は時間と共に著しく増大し，特に Chl の量が多い場合はこの傾向が著しいが，発色後 24 h (25°C) 程度経つと一応安定した状態になるのでその際の色調を示すと **Table 1** の通りである。

すなわち Chl の量が試薬 1 cc 当り 0.2γ の場合は試薬添加直後はもちろん，24h 経つてもほとんど呈色しない。2γ では 24 h 後ようやくうすいピンク色になる。Chl の量が多量の場合は試薬添加後約 10 min ですでに発色をはじめ，この時にはピンク色であるが，時間と共に著しく増大し，かつ黄色味を帯び，24h 後には濃い橙色になる。

Table 1.　コレステロールの量による呈色の状態の違い
Difference in color tone depending on the amount of cholesterol developed by $SbCl_3$ reagent at 25°C.

$SbCl_3$-$CHCl_3$ 試薬 1 cc 中のコレステロール Cholesterol per ml of $SbCl_3$-$CHCl_3$ reagent.	24 h 後 (25°C) Color observed after 24 hours.	
0.2γ	発色せず	Colorless
2.0γ	ごくうすい淡紅色	Faint pink
20 γ	淡紅色	Pink
70 γ	〃	Pink
210 γ	鮭紅色	Salmon pink
3mg	橙黄色	Orange

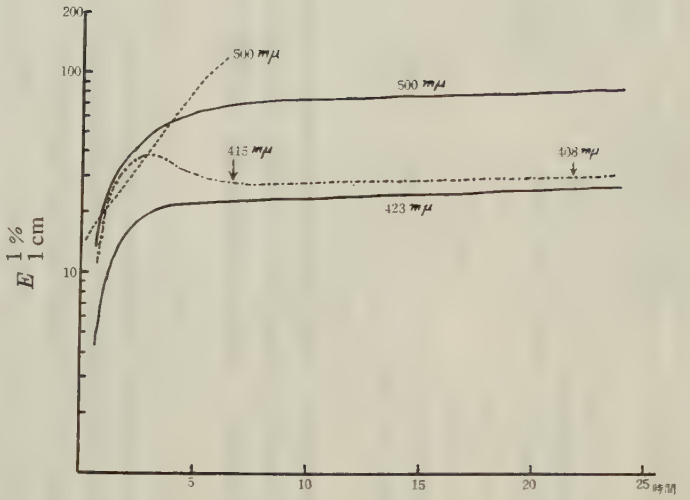
このように Chl の発色は少量の場合と多量の場合とでは異なるので，二，三の予備試験の後 Chl の少ない場合として 70γ/cc，多い場合として 200γ/cc のものにつき，吸収スペクトルの時間的変化の吟味をおこなつた。**Fig. 1** この両者につき，それぞれ発色後，30 min, 2 h の吸収スペクトルを **Fig. 1** に示す。図の縦軸はもとの Chl に対する $E^{1\%}_{1\,cm}$ でポした。

すなわち 70γ/cc の場合は，図の実線のごとく，発色後 30 min では 500 mμ に主極大，420 mμ 附近に第 2 の極大を有し，両極大共時間と共に増大をつづける。また，200γ/cc の場合は，図の点線のごとく発色後 30 min では前の場合に比して発色が強く，2 h 後には 70γ/cc の場合とかなり異なつた吸光曲線をポす。

以上の関係をグラフにポせば **Fig. 2** のごとくである。すなわち 70γ/cc の場合には発色後 5～6 h で両極大共増大がゆるやかとなり，15 h 程度経つと，それぞれほぼ一定に近い値となる。

次に 200γ/cc の場合には，発色後短時間の間は 500 mμ の極大が 423 mμ の極大よりも高いが，後者の増大が早いために間もなくこの逆となる。しかしその後 423 mμ の極大は増大を停止し，やがてやや低下して 415 mμ に移り，以後はあまり変化せず 24 h 後には 408 mμ に移る。一方 500 mμ の極大は発色後指数直線的に増大し，70γ の場合に比してはるかに高い E 価をポす。

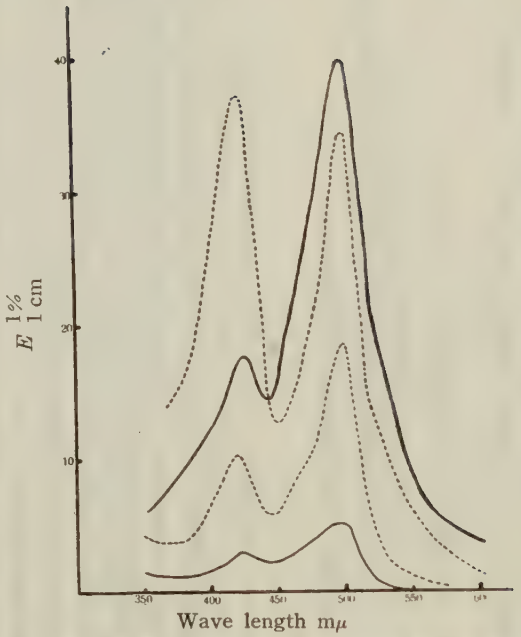
なお，本実験の 5 時間以後は呈色が濃厚に過ぎて原液のままでは測定できない。しかしこの場合，呈色液



Hours after the addition of reagent

Fig. 2. $SbCl_3$ 試薬によるコレステロールの呈色物の吸光値の時間的変化
実線 70 γ/cc, 点線 200 γ/cc

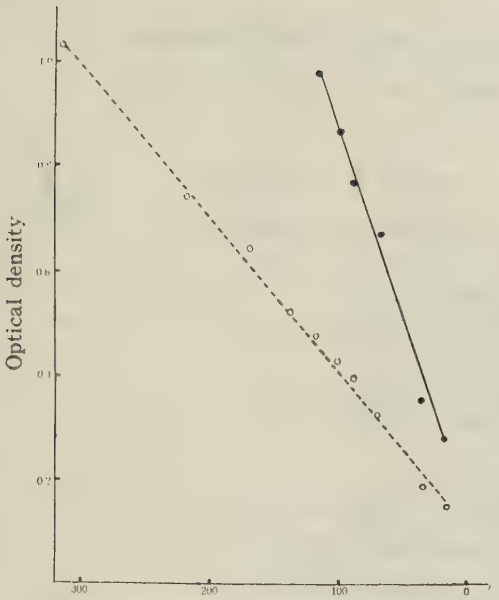
Relation between the time and the color development of cholesterol with $SbCl_3$–$CHCl_3$ reagent.
Solid lines: 70 micrograms, dotted lines: 200 micrograms per ml. of the reagent.
In the case of the latter the 423 mμ maximum was observed to move to 415 mμ and finally to 408 mμ.



Wave length mμ

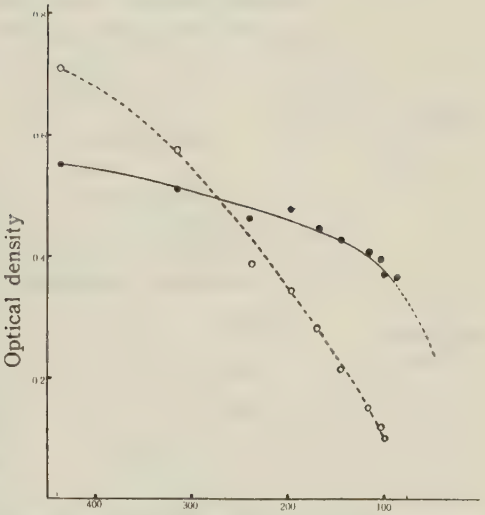
Fig. 1. $SbCl_3$ 試薬によるコレステロールの呈色物の吸光曲線
実線は 70 γ/cc, 点線は 200 γ/cc, おのおの下方の線は試薬添加後 30 分, 上方の線は 2 時間後の吸光曲線。

Absorption spectra of color reaction products of cholesterol with $SbCl_3$–$CHCl_3$ reagent.
Solid lines: 70 micrograms, dotted lines: 200 micrograms of cholesterol per ml. of the reagent. Lower lines of the both show 30 min., upper lines 2 hrs., after the addition of the reagent.



Dilution expressed in microgram of cholesterol per ml. of the reagent.

Fig. 3. 発色増大中の液を更に $SbCl_3$ 試薬でうすめた時の E 500 mμ (実線), E 423 mμ (点線) の変化。
Change of the absorption at 423 mμ and 500 mμ with dilution of the reaction mixture in which the coloration is still increasing. The former decreased in proportion to the quantity of newly added reagent, while latter out of proportion.
Solid line: 500 mμ. Dotted line: 423 mμ.



Dilution expressed in microgram of cholesterol per ml. of reagent.

Fig. 4. 発色報大がほぼ停止した液を更に $SbCl_3$ 試薬でうすめた時の E 500 (実線), E 408 mμ (点線) の変化。
When the coloration has ceased to increase about 24 hours after addition of the reagent, absorption at 408 mμ and 500 mμ of which decreases in proportion to the quantity of the newly added reagent.
Solid line: 500 mμ. Dotted line: 408 mμ.

を稀釈すると, E 500 mμ と E 423 mμ との比率が変化することを認めたので, 次にこの点を吟味した結果をのべる。

2) 呈色液を稀釈した時の吸光値の変化

i) 発色初期には前記のように 500 mμ, 423 mμ 両極大の吸光値が急激に増大してゆくが, この呈色液を試みに $SbCl_3$-$CHCl_3$ 試薬で種々の濃度に稀釈してみたところ **Fig. 3** の結果を得た。すなわち 423mμ の極大はうすめるにしたがつて比例的に減少してゆくが, 500 mμ の極大ははるかに減少し難い。すなわち Chl と $SbCl_3$-$CHCl_3$ 試薬の比率が変るにしたがつて新たに反応が追加されてゆくごとき様相を呈することが観察された。

ii) これに反して発色後1昼夜程度経過 423 mμ の極大が 408 mμ に移つて一応安定状態となつたものを $SbCl_3$-$CHCl_3$ 試薬で順次稀釈を試みると **Fig. 4** に示すように E 500 mμ, E 408 mμ 共, 比例的に稀釈されてゆくことが知られた。

3) 反応生成物の検索

以上のごとく $SbCl_3$-$CHCl_3$ 試薬による Chl の呈色は濃度, 時間等によつて変化することが知られたが, この機構の一端を知る目的で反応生成物の回収実験をおこなつた。

すなわち Chl 327 mg に $SbCl_3$-$CHCl_3$ 試薬 100 cc を加え, 20°C にそれぞれ 1.5 h (Sample I とす

Table 2. 呈色反応生成物をアルミナクロマトクラフィーにより分画した各画分の性状

Fractions separated chromatographically from the products of cholesterol reacted with $SbCl_3$-$CHCl_3$ reagent.

Sample	Fr. No.	展開剤 Solvent used	乾固物の外観 Appearence of the substance	収量 Yield %
I Reacted for 1.5 hrs.	1	Petro-ether	淡黄色，油状 Pale yellow, oily	14.1
	2	Petro-ether～10% Ether Petro-ether	淡黄色，不定形の固体 Pale yellow, solid, m.p. 110°C	40.6
	3	10% Ether Petro-ether	黄褐色，油状 Yellowish brown, oily	2.2
	4	20% 〃	淡黄色，油状（微量） Pale yellow, oily	1.4
	5	30% 〃	同上 Same above	2.6
	6	50% 〃	白色不定形の固体 white, solid, m.p. 139～144°C	38.1
	7	Ether	淡黄色，油状（微量） Pale yellow, oily	1.0
II Reacted for 24 hrs.	1′	Petro-ether	黄褐色，油状 Brownish yellow, oily	38.1
	2′	Petro-ether～10% Ether Petro-ether	淡黄色，不定形の固体 Pale yellow solid m.p. 95～109°C	41.6
	3′	10% Ether Petro-ether	淡黄色，油状（微量） Pale yellow, oily	0.2
	4′	20% 〃	同上 Same above	3.5
	5′	30% 〃	淡黄色，油状 Pale yellow oily	4.2
	6′	50% 〃	やや黄を帯びた白色不定形の固体 Yellowish white solid, m.p. 134～138°C	8.9
	7′	Ether	淡黄色，油状（微量） Pale yellow oily	trace

る），24 h (Sample II とする) 保つた後，KOH とエーテルを用いて $SbCl_3$ を分解してステロールを回収し，黄褐色油状物を得た。回収率は原料 Chl に対しそれぞれ，97.2% であつた。

次に I，II をそれぞれ石油エーテル溶液としアルミナのカラムクロマトにかけ，エーテル・石油エーテル混液をもつて順次展開し Table 2 のごとき画分を得た。この各画分の紫外部吸収スペクトルは Fig. 5 の通りである。なお，図には原料 Chl の吸収スペクトルをもあわせて示した。

それぞれの画分のうち，量的に多いものは 1, 2, 5, 6 および 1′, 2′, 5′, 6′ であり，試料 I，II の各画分の組成を比較すると，1′ は 1 よりもかなり増加し，反対に 6′ は 6 よりも著しく減少し，2, 2′ および 5, 5′ においては大きな差異がない。吸収スペクトルから見て，1, 1′ は類似の共役化合物，2 はそれと別の共役化合物と考えられる。ただし 1, 1′ と 2 とは極大の位置がかなり一致しているから，1, 1′ の中にも相当量の 2 が混入しているのかもしれない。2′ は 2 とはまた別の共役化合物であろう。

5, 5′ は類似の非共役化合物，6, 6′ は未反応の Chl と考えられる。

以上の結果から考えると，Chl の発色の経過中に，Chl → 235 mμ に大きな吸収をもつ物質 → 265, 275, 287 mμ に極大をもつ物質 → 292, 305, 320 mμ に極大をもつ物質を順次生じてゆくのではないかと想像される。

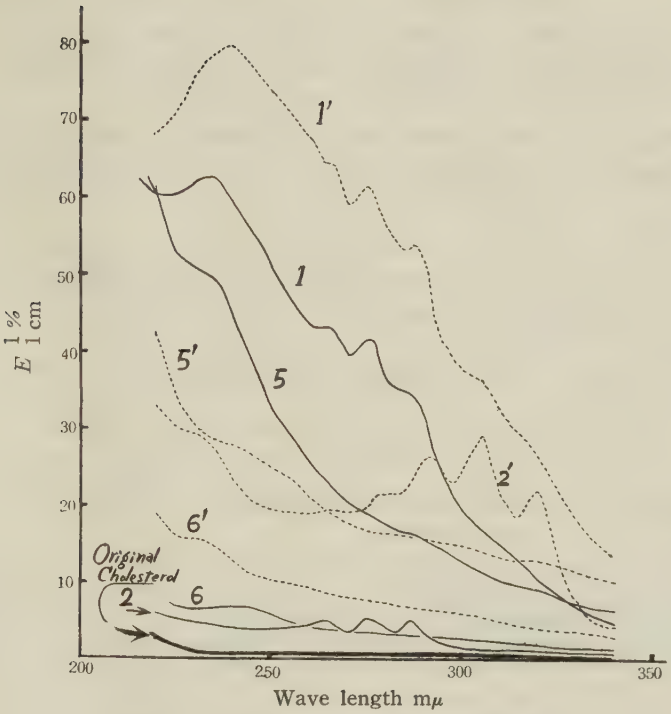


Fig. 5. 呈色反応生成物各画分の吸光曲線

Absorption curves of the fractions chromatographically separated from the reaction products of cholesterol with $SbCl_3$-$CHCl_3$ reagent. Solvent: ether. On the numbers of fractions see Table 2.

考　　察

Chl の比色定量には，氷酢酸—硫酸混液による Lieberman-Burchard 反応を利用する方法が古くから用いられ，その呈色機構も詳細に吟味されているが，$SbCl_3$-$CHCl_3$ 試薬におけるものははなはだ少ないのは Siblikovà[6] もいうごとく，Chl の定量のためには，$SbCl_3$-$CHCl_3$ 試薬も便利さの点で硫酸試薬と大同小異であり，特に硫酸試薬をすてて，$SbCl_3$-$CHCl_3$ 試薬を採用する程の理由がないためであろう。

$SbCl_3$-$CHCl_3$ 試薬により発色する物質はビタミン A, D, Chl のみに限らず，はなはだ多種類にのぼつている。しかしその呈色物の吸収スペクトルや呈色の時間的変化などは物質によりそれぞれ異なつているから，今後肝油中の未知成分を検索する上にこの試薬を応用することは一つの有力手段と考えられる。本報はこの意味で Chl の呈色につき従来知見の不充分であつた点を吟味したもので Chl の比色定量法の作成を目的としたものではない。

本実験の結果に明らかなように，Chl は量によつて発色の様相が異なり，また時間と共に種々の中間体を生ずるため定量的な再現性を望むのは困難であろうが，しかし本報のごとき定性ないし半定量的な知見の範囲でも，肝油不ケン化物に関する今後の研究に多少の寄与をなしうるものと考える。

摘　　要

アルミナクロマトにより精製したコレステロールを用いて $SbCl_3$-$CHCl_3$ 試薬による発色を検し次の結果を得た。

1) コレステロールの量が $SbCl_3$-$CHCl_3$ 試薬 1 cc 中 2γ 程度の場合は 24 h 放置後にようやく発色するが，量が多くなるにつれて発色が早く，時間と共に濃厚になり，かつ黄色味を帯びる。

2) 呈色物の吸収極大は 500 mμ および 423 mμ にあるが，それぞれにおける E 価およびその時間的変化はコレステロールの量の少ない場合と多い場合とで著しく異なる。

3) 発色増大状態にある呈色液を再び $SbCl_3$-$CHCl_3$ 試薬で稀釈すると，423 mμ の E 価は稀釈に比例して低下するが，500 mμ の E 価ははるかに低下し難い。これに反し発色が安定状態となつたものは両者共比例的に稀釈される。

4) 呈色液を KOH で分解して，ステロールを回収し，アルミナクロマトにより検索し，数種の共役化合物を得，呈色反応は，コレステロール → 235 mμ → 265, 275, 287 mμ → 292, 305, 320 mμ にそれぞれ極大を有する物質を生ずる方向に進むものと想像した。

本研究にあたりご指導をいただいた東秀雄利用部長に厚く御礼申し上げます。

文　　献

1) ZIMMERLI, NIELD: *J. Biol. Chem.*, **148**, 254 (1943).
2) 沼田克彦：ビタミン，**11**, 5, 439 (1956).
3) 藤田秋治，森元博久：ビタミン，**21**, 1, 65 (1960).
4) 三輪勝利：ビタミン，**14**, 6, 755 (1958).
5) Cholesterol (1958), Academic Press Inc., p. 24 より引用.
6) O. SIBLIKOVA and I. M. HAIS: CA 10495 f (1958), *Ceskoslov, farm*, **7**, 1～13 (1958).

ビタミンDの定量法および水産物中のビタミンD含量*

東海区水産研究所　東　秀雄・山川健重・衣巻豊輔・杉井麒三郎・岩崎喜久子

DETERMINATION OF VITAMIN D IN FISH AND FISH PRODUCTS BY CHROMATOGRAPHY WITH JAPANESE ACID CLAY

Hideo Higashi, Takeshige Yamakawa, Toyosuke Kinumaki, Kisaburo Sugii and Kikuko Iwasaki

Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Tokyo

Methods previously proposed for the vitamin D determination are not available for separating vitamin D from impurities contained in fishes and fish products. However, a series of experiments the authors carried out, demonstrated that a combined use of clay chromatography and gradient alumina chromatography was highly efficient for the purpose. On the basis of studies on the nature of Japanese acid clay to be used for the chromatography, suitable conditions and methods for activation of the clay were secured. Satisfactory results were obtained in the experiments performed by the use of sample oils prepared from various parts of fishes, dried fishes and fish solubles.

Dの理化学的定量法は多くの研究者[1)~13)]によつて研究されれているがこれらの方法はいずれもD以外の不純物，とくにAが少ないばあいにのみ比較的信頼できる値を示す．また米国局法に記載されている方法[14)]も薬剤中のD定量には応用しうるが，水産物中のD定量には応用できない．そこで著者らは吸着剤として適当に活性化した日本産酸性白土(以下単に白土と記す)とともに活性アルミナを併用することにつき研究した．その結果，大部分の水産物中のDを正確に定量することができたので，ここに報告する．

試薬および器具

(1) **活性化アルミナ**　Merck 製吸着用アルミナをそのまゝ用いた．

(2) **石油エーテル**　日本石油製一級品を蒸溜し主溜部(40～60℃)を無水芒硝で脱水して用いた．

(3) **エーテル**　市販一級エーテルを用い結晶硫酸第一鉄と濃硫酸で過酸化物を除去したのち無水芒硝で脱水，1回蒸溜し主溜部を無水芒硝で再び脱水したものを用いた．

*1961年6月7日受理．東海区水産研究所業績B第357号

(4) クロロホルム　市販一級品を濃硫酸とともに振盪洗滌したのち希苛性カリで洗滌し水洗後1回蒸溜し初溜および後溜を除いたものを炭酸カリを用いて1晩乾燥して用いた.

(5) 三塩化アンチモン　ヨツハタ化学製最純品を上記精製$CHCl_3$から再結晶したものを用いた.

(6) 塩化アセチル　関東化学製特級品をそのまゝ用いた.

(7) 三塩化アンチモン試薬　200mg/cc $SbCl_3$-$CHCl_3$液をつくり使用前に2%の塩化アセチルを加えた.

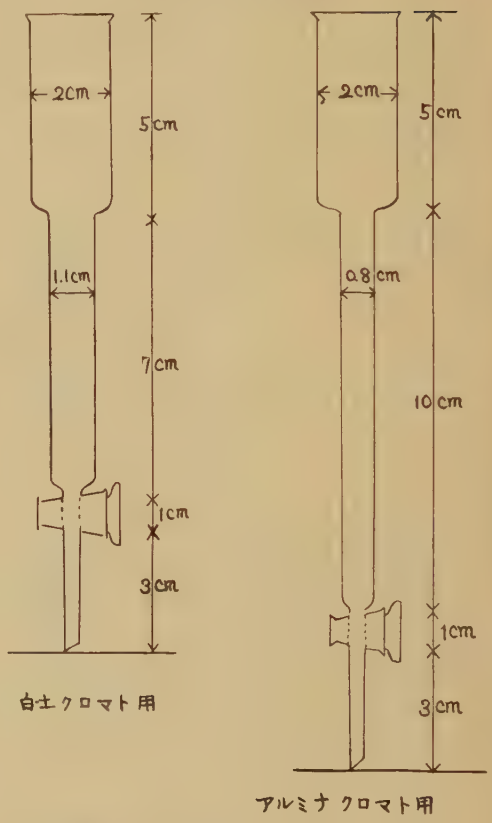
(8) 標準に用いたA　理研ビタミン製結晶A-アセテートをケン化, 抽出しA-アルコールとして用いた. 330万I.U./g.

(9) 標準に用いたD_2　理研ビタミンから購入したD_2をアセトン水から再結晶したもの($E^{1\%}_{1cm}$ 265mμ=470, mp. 115℃) をさらにアルミナ・クロマトにより精製した.

(10) 標準に用いたD_3　Peboc製D_3油溶液200万I.U./gをケン化しステロールを除去して用いた.

(11) クロマト装置　図1のようなガラス製装置を使用した. 吸着管の内径はとくに正確につくる必要がある.

図1　クロマト装置



白土の活性にかんする検討

D定量に白土を応用した研究としては馬場[7]および三輪[8]の方法がある. しかしこれらの報告では白土の活性化にかんする検討が不十分なうえ, 定量障害物の除去および分解生成物の吟味が欠けているように思われた. 著者らは白土を種々の条件で活性化しDの定量に使用し得る白土を調製するため下記の実験を行なつた.

実験にあたつてはクロマトに適した粒度で活性度の異なつた白土をつくり, いろいろの条件でAおよびDのクロマトを行なつた. Aの白土クロマトで溶出されたA分解物をさらにアルミナクロマトにかけ溶出物の性質をもとにして白土の活性化法の適否を定めることにした.

(1) クロマトに適した白土の製法

クロマトに使用する白土はそのまゝでは細かすぎてCeliteのような濾過助剤を混ぜてもクロマト処理に長時間を要し, Dの破壊の危険もあり, 実用的でないのでまず適当な大きさの粒とすることにした.

そのため市販白土にたいしその70%重量の水を加え, よく練りあげチョッパーで麺状におしだし, 95～100℃で乾燥後粉砕し100メッシュのふるいを通過し150メッシュのふるいを通過しない粒をとり適当温度(後述する)で加熱活性化しP_2O_5を乾燥剤とするデシケーター中に保存した.

(2) 白土クロマトの方法

吸着管の底部に脱脂綿をつめ脱水乾燥したE・[*1] PE[*2] (3:7)を注ぎ, これに前述の白土を適当量(通例4g, 後述する)を流し込み細いガラス棒でかるくかく拌しながらつめ, 活栓を開いて溶媒を下方に流出させる. 白土の層は約6cmになる. ついであらかじめ作つておいた試料のE・PE (3:7) 溶液を上端より注加し, さらにE・PE (3:7)で洗い, その50ccを採り溶剤を除き測定に使用した.

*1) E=Ether　　*2) PE=Petroleum ether

（3）　アルミナクロマトの方法

アルミナを吸着剤として使用するときはE・PE(1：9)で懸濁させたアルミナ5gを吸着管に流し込み溶媒を下方に流出させながら自然に沈降させる．アルミナの層は約11cmになる．これに白土クロマトを通過した試料を添加し，E・PE (1：9)，E：PE (3：7)，Eのそれぞれ50ccで溶出し各画分に分離した．

（4）　$SbCl_3$試薬による呈色の方法

D相当画分の溶剤を蒸発したのち$CHCl_3$の一定量にとかし，その0.3cc に$SbCl_3$試薬3.0ccを加え混和後1分の値を分光光度計 (500mμ，1 cm)でよんだ．

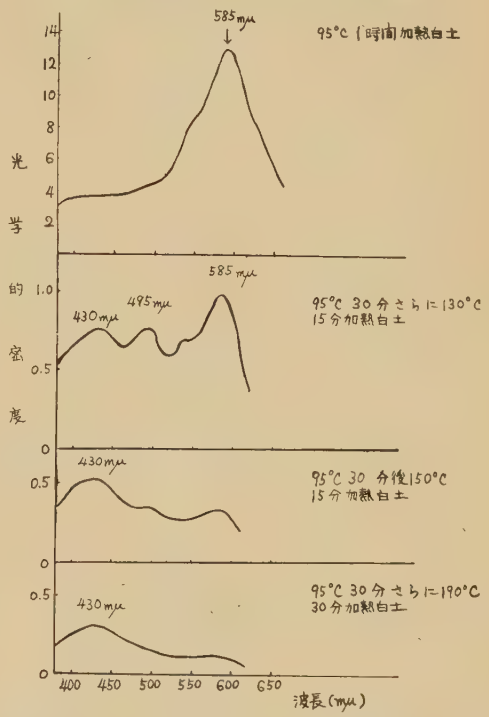
（5）　白土の活性とAの分解物との関係

白土クロマトはDと共存しD定量を防害するAを分解吸着させることに特長があるが，分解物のすべてが除けるわけではなく，その一部がD画分にくることはまぬがれない．そこで使用する白土による分解物についての検討が必要となる．

A分解物にかんしてはD定量法の報告のうち2,3のものおよびEmmerie・Eekelen[15]，Mennier・Vinet[16]の報告などに述べられているが，吸着剤の活性度と関連づけて検討したものは少ない．

著者らは活性を異にする白土により分解溶出されてくるA起源の物質の紫外部および$SbCl_3$試薬反応による呈色液の吸収スペクトルならびにアルミナクロマトにたいする態度を検討した．まず粒状白土を95～100℃の蒸気浴中で加熱後さらに鉄板上で130℃より190℃までの各温度で加熱した．これらの白土を用い結晶A-アセテート(290万I.U.)より作つたA-アルコール10mgを上記の条件でクロマト吸着を行ないE・PE (3：7)50cc中に溶出されてくるA分解物をとる．その$SbCl_3$試薬による呈色液のスペクトルをみた．図2に示すように呈色スペクトルの形状および強度は使用した白土の加熱条件によりいちじるしく異なつていた．すなわち95～

図2　種々の白土により生ずるA分解物の$SbCl_3$試薬による呈色液の吸収曲線



100℃で加熱した白土を使用したばあいのA分解物の吸収スペクトルは波長585mμに極大を有する（以下これを585 Chromogenと記す）．このスペクトルの強度は比較的大きい．さらに高温で加熱した白土を使用すると430mμの極大がみられるようになり（以下これを430 Chromogenと記す），190℃ではほとんど430mμの極大のみになる．このスペクトル強度はひじように小さい．この点をたしかめるために95℃加熱および150℃加熱の白土を使用したクロマトにより得られたA分解物をさらにアルミナクロマトにより数画分にわけ，その性状を検討した．

表 1　95～100℃加熱白土によるA分解物のアルミナクロマト

画分番号	展開溶剤	重量(%)	呈色極大* (mμ)	$E^{1\%}_{1cm}$ 585mμ	紫外部* 吸収極大(mμ)	溶解性
クロマト前		(100)	585			
1	E・PE (1：9)	30	585	831	335, **370**	アルコール難溶
2	E・PE (3：7)	19	585	604	335, **350** **370**, 260	アルコール難溶
3	E	4	585	2,060	293.5, **330** **255**	アルコール可溶

* 呈色，紫外部吸収は強度の順に配列する．太字体は Inflexion を示す（表1～4）．

図3　95～100℃加熱白土によるA分解物のアルミナクロマト

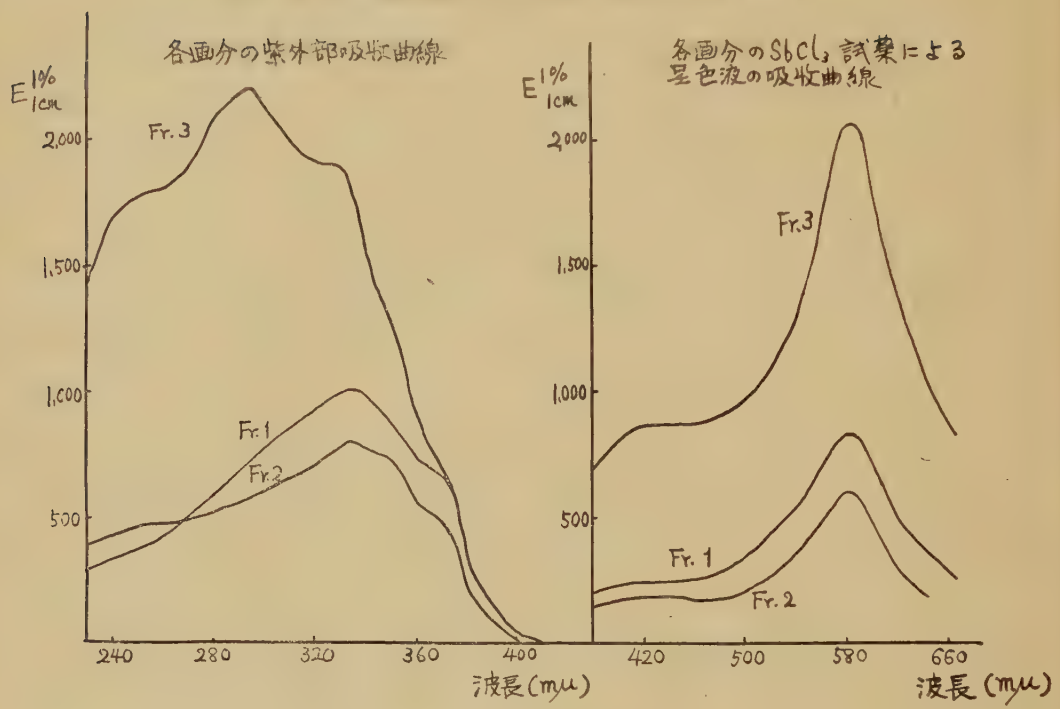


表2　150℃ 加熱白土によるA分解物のアルミナクロマト

画分番号	展開溶剤	重量(%)	呈色極大* (mμ)	$E^{1\%}_{1cm}$	紫外部* 吸収極大(mμ)	溶解性
クロマト前		(100)	430, 585, 494			
1	E・PE (1：9)	58	430, 585, 494	430mμ＝111	290, 245, **322**, **338**	アルコール難溶
2	E・PE (3：7)	28	430, 585	430mμ＝175	290, **278**	アルコール可溶
3	E	2	585, 430	585mμ＝126	290, 249	アルコール可溶

表1,2および図3,4にその結果を示す．この結果からみると活性の弱い白土によるばあい，アルミナクロマトの各画分にくる分解物はすべて585Chromogenであり中間の比較的強い白土によるばあいは 430, 495, 585mμと3つの極大を示す物質（以下極大3コを有するChromogenと記す）と430 Chromogenの2種になる．極大3コを有するChromogen はアルコールに難溶であるが430Chromogenは可溶であるから溶解度の差により精製することができる．精製されたおのおののChromogenを再びアルミナクロマトにかけた結果極大3コを有するChromogen はこの条件のクロマトでは主として第1画分に来，430 Chromogen は第2画分にくることがわかつた(表3,4)．また表1において585 Chromogenは主として第1画分に来，アルコールに難溶であるから極大3コを有する Chromogenは430 Chromogenと585Chromogenの混合物ではなく別種のものと考えられる．また活性の強い白土により強く吸着される部分から得られる585Chromogenと活性の弱い白土から生成する585Chromogenとは異なるものであると考えられる（この点については後にやゝくわしく検討した)．

（6） 活性の異なる白土によるDの分解

前項においてAの分解物の量および種類が白土の活性によりはなはだしく異なることを明らかにしたがD定量に使用すべき白土はA分解物をよく吸着すること

図4　150℃加熱白土によるA分解物のアルミナクロマト

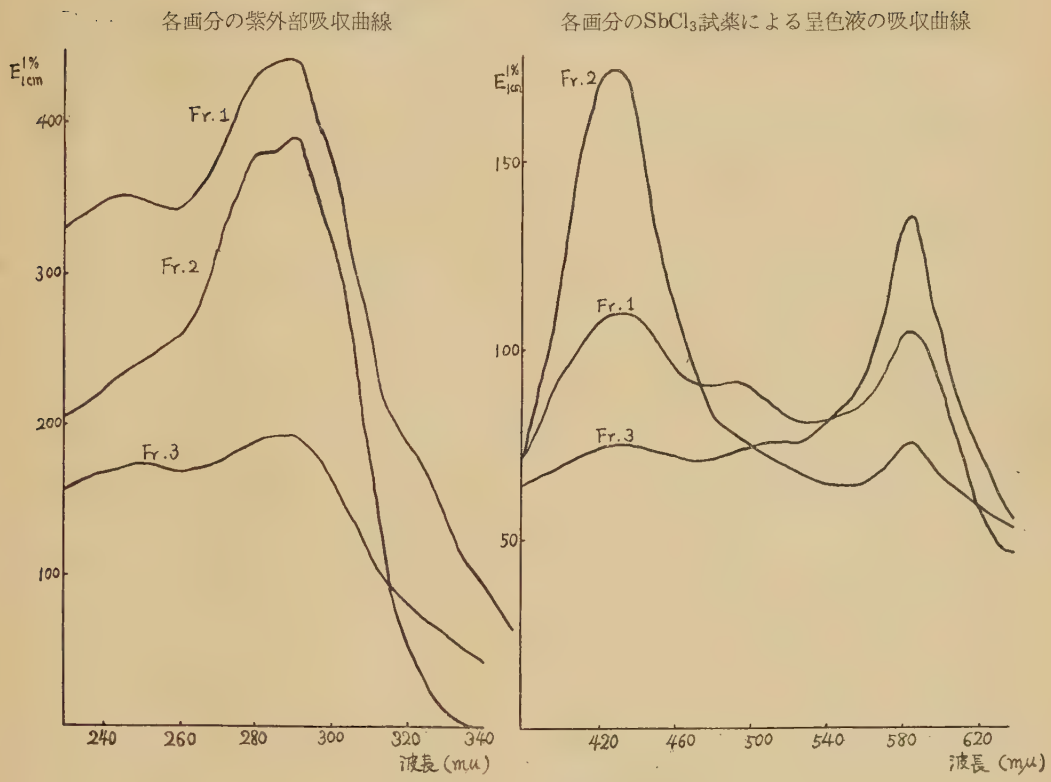


表 3　表2の第1画分より得た物質の精製後再クロマト

画分番号	展開溶剤	重量（%）	呈色極大*（mμ）	$E^{1\%}_{1cm}$ 430mμ	溶解性
クロマト前		(100)	430, 495, 590	136	アルコールに難溶の白色粉末
1	E・PE（1：9）	74	430, 495, 590	175	同上
2	E・PE（3：7）	24	430, 500, 585	27	同上

表 4　表2の第2画分より得た物質の精製後再クロマト

画分番号	溶出溶剤	重量（%）	呈色極大*（mμ）	$E^{1\%}_{1cm}$ 430mμ	溶解性
クロマト前		(100)	430, 585	403	アルコール可溶
1	E・PE（1：9）	28	430, 585, 500	378	アルコール難溶のものあり
2	E・PE（3：7）	64	430, 585	307	アルコール可溶

が必要であると同時にDを完全に溶出させる必要がある．そこで前記と同じ白土にD20γをかけ回収率をみた．表5より明らかに高温(130～190℃)で加熱したもの，すなわちAより430 Chromogenをつくる白土はすべてD回収率が悪くD定量に適当でないことがわかつた．

（7）　白土活性化法の吟味

以上の試験の結果D定量用には95～100℃ に加熱した白土しか使用できないことがわかつた．しかし，こ

表5　種々の白土によるD回収試験

白土の加熱条件	D回収率(%)
95℃, 1時間加熱	100
95℃, 30分後さらに130℃, 15分加熱	50
95℃, 30分後さらに150℃, 15分加熱	34
95℃, 30分後さらに190℃, 30分加熱	0

のさい加熱時間が長いと白土クロマトのさいDの回収率がいくぶん低下することがある．D画分にくる585 Chromogen 量も加熱時間と関係している．この量が少ないほど望ましいことはいうまでもない．そこでクロマトに適した白土の製造条件をさらに吟味した．

1)　細粉白土製造条件の吟味

細粒にするために加えるべき水の量を50%および70%とし，それぞれ異なる加熱条件*3)で脱水した白土を使用し白土クロマトを行ないD回収率をみたところ表6のような結果を得た．この表より明らかなように50%の水を加えて作つたばあいには加熱時間が長くなるとD回収率の低下をおこすが，70%とすればこの懸念がないことがわかつた．

2)　細粒白土の加熱による活性化

前記のように水を70%加え加えた水に相当する重量減のところまで脱水してから細粒にした白土25g を径6cmのシャーレに入れ0時間（加熱をせずにデシケーター中に入れる），2，4，6および8時間加熱し，ただちに P_2O_5 のデシケーター中に入れ1夜（16時間）後DおよびAの白土クロマトを行ないDの回収率および585Chromogen量を調べ，図5のような結果を得た．これより明らかなように585 Chromogen 量は加熱による重量減（おそらく含有される水分の量）とは逆相関の傾向を示すがDの回収率はこれと関係なく加熱時間に比例して低下する傾向があるように思われる．したがつて2時間以上の加熱は避けるべきである．

以上の実験は白土を比較的薄層にしたときの結果であつて実際的でないので，層の厚さを約3cmにして加熱し同様の実験を行なつた結果を図6に示す．この図に見られるように，減量のおこるようすは薄層のばあいよりもおくれるが，その他の傾向はほぼ同様であつた．

3)　デシケーター中の保存と585 Chromogen生成

表6　細粒白土の製造条件の吟味

加えた水の量(%)	加熱時間(hr)	D回収率(%)	585 Chromogen のE価
50	8	100	71.5
50	10	82	31.9
50	14	85	22.5
70	9	100	40.7
70	11	100	44.0
70	15	100	22.0

図5　細粒白土の加熱による活性化（薄層のばあい）

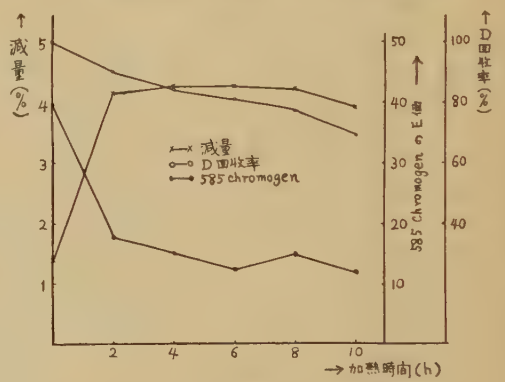
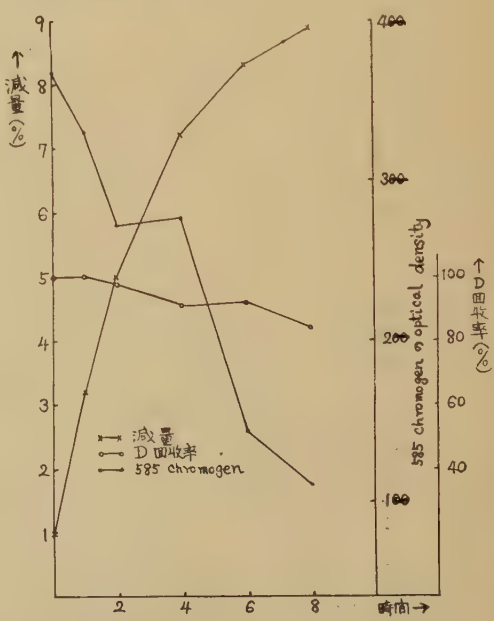


図6　細粒白土の加熱による活性化（層の厚いばあい）



*3)　加熱条件は加えた水に相当する重量減をおこすまでの加熱時間をもととし，さらに2時間および4時間加熱した．

量との関係

前述のように585 Chromogenの生成量が減量と比例し，D回収率が加熱時間に逆比例するものとすればD回収率の良好な白土を長期間デシケーター中に保存すればD回収率の低下をおこすこともなく585 Chromogenの生成量は低下するものと考え，保存した白土を使用しクロマトを行なつた結果，表7に示すように予想どうりの結果を得た。

（7） 白土量と585 Chromogen生成量との関係

前項の実験によりクロマトに適した白土の製法および保存法が確立したので白土使用量を増すことにより585Chromogenの生成量を極力少なくすることをはかつた．その結果，表8に示すように白土量を4gから6gに増すことにより，生成するChromogen量はそうとう少なくなり，しかもD回収率に影響がないことがわかつた．そこでAその他の不純物がDに比して著しく多量に含まれているような試料の定量のさいには適宜白土使用量を増せばよいことになる．

（8） 種類の異なる白土の使用

普通わが国で生産される白土は産地によりかなり性状が異なるといわれている．したがつて産地を異にする別種の白土を使用したばあいにも著者らの方法が適用できるかどうかを試験する必要がある．以前わが国には各地に白土の生産工場があり，数多くの銘柄の白土が販売されていたが現在ではこゝにあげる2,3の製造業者が限られた鉱区より採堀販売しているだけなので実際問題として，それらの白土について試験すれば

表7　デシケーター中の保存と585 Chromogen生成量との関係

保存時間（日）	585 Chromogen のE価
1	330
4	93

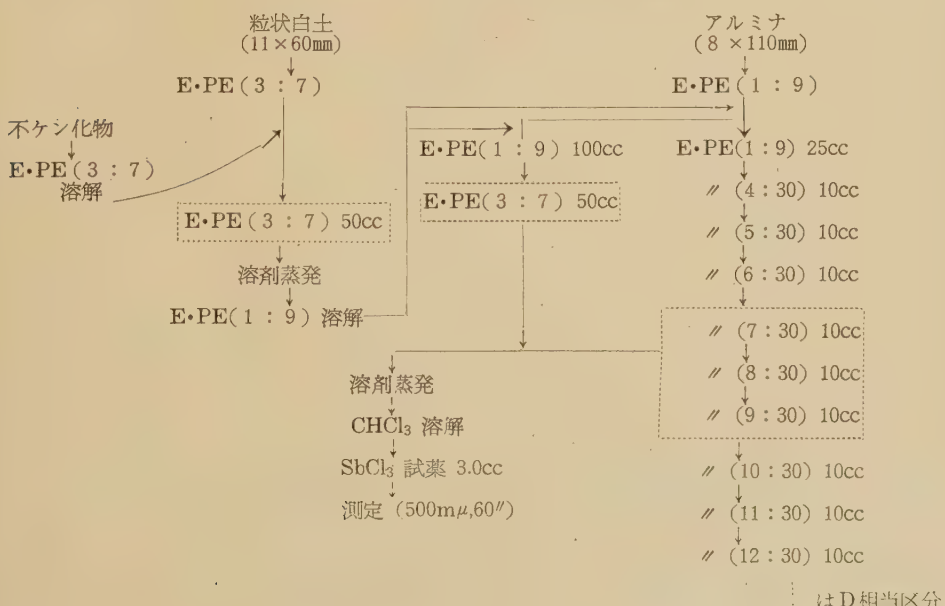
表8　白土量と585 Chromogen生成量との関係

白土量（g）	585 Chromogen のE価	D回収率（%）	溶剤量(cc)
4	460	100	50
6	220	97	50
8	144	92	60

表9　白土の種類

白土の種類	産地	585 Chromogen のE価	D回収率（%）
水沢化学工業 a	山形県	500	97
同　上　b	同上	635	100
日本活性白土	新潟県	624	100
関東ベントナイト	群馬県	—	—

図7　二重クロマトによるD定量操作



十分と考えられる．

試験結果は表9に示すように水沢化学の a, b 2種と日本活性白土のものは使用可能であつた．関東ベントナイトのものは前記のものとは物理的性質がひじように異なりAと反応して青色を呈しないので試験するまでもなく使用不可能なことがわかつた．

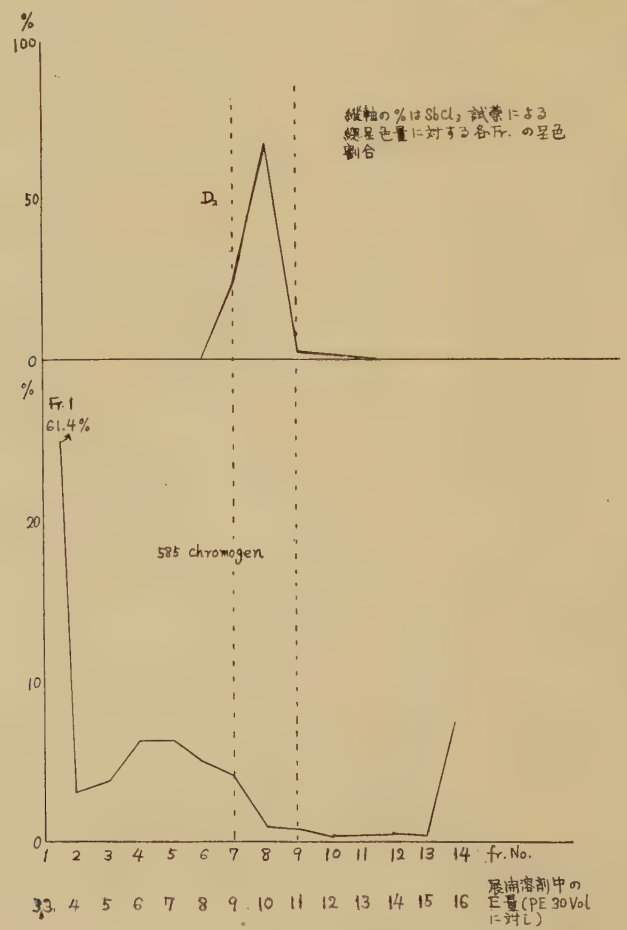
段階的アルミナクロマトによるA分解物とD画分との分離

以上の試験の結果，適当に活性化された白土にAをかけたときD相当画分にくる 585 Chromogen は比較的多いのでA：Dの比が大きい試料中のDを定量するさいにはこの Chromogen とDを呈色反応にさきだち分離する必要がある．

得られた585 ChromogenおよびD$_2$50γをPlackら[17]の方法にならつて段階的クロマトを行なつた．すなわち試料溶液を活性アルミナ吸着層に通しE・PE (1：9) で溶出し最初の25ccをすて，さらに徐々に溶出液の極性を強め溶出をつづける(図7参照)．図中Fr. 7～9*4がD画分であるから，この画分の溶剤を蒸発したのち測定に使用する．

段階的アルミナクロマトの結果図8に示すような溶出曲線が得られた．図から明らかなようにAより生ずる585Chromogenはアルミナクロマトによりクロマト的性質の異なる3つの画分に分けられるが大部分はDの画分と完全に分離することができた．そこでA 10㎎

図8　D$_2$と585 Chromogenのアルミナクロマトによる分離



*4) アルミナの活性によりD画分が多少ずれることがある．

とD 20γ を混合したものを白土クロマト後，これと同様な条件で段階的アルミナクロマトを行なえばAの影響のほとんどないD画分が得られることをたしかめた．なおこのときのDの回収は完全であつた．

DとA以外の不ケン化物成分の分離測定

前項まではDの定量を防害するAの分離法について述べた．しかし著者らの取扱う試料中にはA以外に種々の不ケン化物成分が当然混入しているから，これらのD定量への影響も知る必要がある．

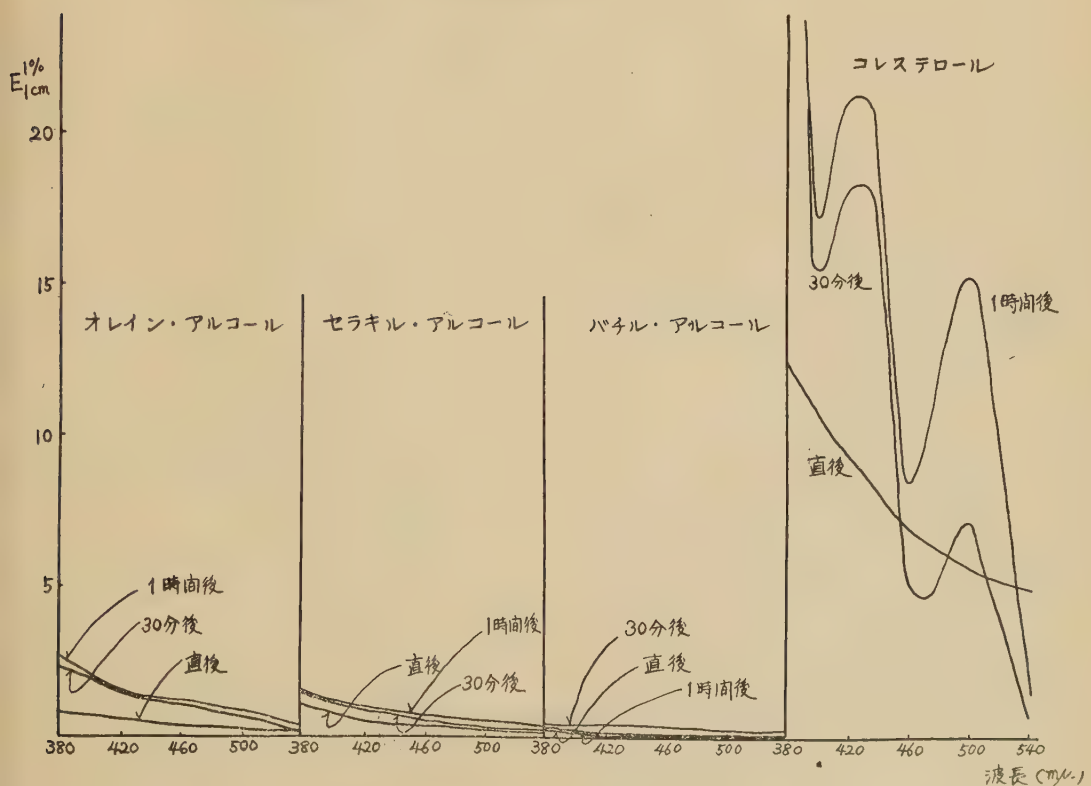
そこでオレイン，セラキル，バチルなどのアルコールおよびコレステリンの$SbCl_3$による呈色液のスペクトルを測定したところ図9のようになつた．

これより明らかなようにオレイン，セラキル，バチルなどのアルコール類の呈色値はDに比してはなはだ低く1/2000以下であるからたとえD画分にこれらのアルコールの混入があつても無視することができる．

またコレステリンはかなりの呈色値を示し無視できないがメタノールに溶解し冷却し析出する結晶を除くことにより，ほとんどD定量に影響しないようにすることができる．

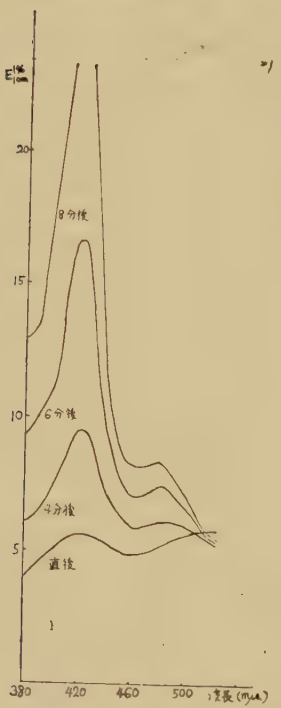
ところが著者らの取扱つた試料特に肉，皮などの脂質の不ケン化物中にはコレステリン以外のステロイドがあり，これがD定量を防害することがわかつた．このステロイドはコレステリンのように冷却によつて析出物を除く操作(後述する)によつては完全には分離できない*5)．またこれはアルミナクロマトによつてもD画分に混入し，しかも図10に示すように$SbCl_3$反応の呈色値が短時間でいちじるしく増大する特長をもつている．したがつて水産物中のD定量においては，このステロイドの除去が不可欠な要素になる．しかしさいわいジギトニン処理によりジギトニドを形成するのでジギトニドを分離すれば完全に除去でき呈色値は波長

図9　オレイン，セラキル，バチルなどのアルコールおよびコレステリンの$SbCl_3$試薬による呈色液の吸収曲線



*5) 沼田[8]のメタノール沈澱法によつてもこのステロイドは完全には分離できない．

図10 ヨシキリザメより分離したステロイドの$SbCl_3$試薬による呈色液の吸収曲線



340～600mμの全範囲において0となる.

またこれ以外のD定量に影響する不ケン化物成分も段階的アルミナクロマト処理により，ごく少数の例外を除けばDと分離できる．したがつて大部分の水産物中のDは著者らの方法の組合わせにより定量できることになるので，つぎに定量方式を定め実施例をあげることにする.

定 量 方 式

（1） 試料の調製

1） ケン化および抽出

各種水産動物油5～10g[*6]をメタノール・KOH液でケン化しエーテルで不ケン化物を抽出した.

2） メタノール冷却

抽出した不ケン化物を少量のメタノールに溶かし－20℃のフリーザー中で析出する沈澱を濾過し，濾液の溶剤を蒸溜する．沈澱が多いばあいはこの冷却を数回くりかえす.

3） エタノール(4：1)ジギトニン溶液によるステロイドの沈澱

メタノール冷却処理を経た試料を2ccのエタノール(4：1)にとかしジギトニン液[*7] 1～2cc[*8]を加え加熱後1時間放置する．これを試験管中に濾過し，さらにエタノール(4：1) 1ccとPE 4ccで洗滌する．振盪静置後試験管中の上層を分離し他の試験管に移し下層は4ccのPEでさらに4回この操作をくりかえす．集めたPE層を3ccの水で1回水洗しPEを蒸発する.

（2） 白土およびアルミナクロマト

予備処理した試料について白土クロマトを行なつたのち段階的アルミナクロマトを行なう.

試料の種類によつてはDにたいして非D呈色物が少ないものがある．このばあいには第2段のアルミナクロマトを簡略化することができる．すなわち最初 E・PE(1：9)で溶出したとき最初の100ccをすて，つぎの溶出部50ccをD画分としてとればよい.

（3） 定量値の計算

前述の方法で呈色させ分光光度計で得られたよみをもとにして定量値を計算するため，つぎの式に従つた.

$$\text{D量} = \frac{R \times d \times k}{H'}$$

ただし R ＝分光光度計のよみ

d ＝希釈倍数

k ＝光度計のよみを試料1g中に含まれるD単位になおすための係数

H' ＝供試試料の重量(g)

なおkはD_2の$CHCl_3$液について定めたもので試薬によつて一定ではないが著者らの実験では2,320を用いた.

（4） 著者らの方法による水産物中D含量測定例

上述の定量方式によつて種々の水産物中のDを測定した結果を表10,11および12に示す．測定例が少なく一般的に水産物中のD含量について論ずるには不十分であるが，この表からつぎのことがわかつた.

---

*6) 別に油中のAを測定しAの総量が3.3万I.U.をこえないように試料を秤取する．A含量の少ないものは秤取量を10gとする.

*7) Merck製のジギトニンを80%エタノールにとかしジギトニンが30mg/cc含まれるようにする.

*8) D含量が少なく試料を多量に採らざるを得ないばあいこの程度のジギトニン量ではステロイドを完全に除けないことがある．このようなときには適宜cc数を増す必要がある.

表 10　各種水産物中のD含量

試料名	部分名	含油量(%)	A (I. U.) 油1g中	A (I. U.) 組織100g中	D (I. U.) 油1g中	D (I. U.) 組織100g中	A/D (I. U.)
イワシ	肉	6.4	13	83	83	532	0.2
	内臓	8.3	114	946	71	590	1.6
	廃棄部	7.2	10	72	137	990	0.1
アジ	肉	2.8	4	11	…	…	
	内臓	12.6	—	—	134	1,695	
	廃棄部	5.7	—	—	…	…	
サバ	肉（含皮）	23.8	3	72	6	143	0.5
	皮	17.2	9	16	32	55	0.3
	肝臓	13.3	28,600	380,000	435	5,780	66
マグロ	肝臓	6.7	8,480	56,700	7,800	52,200	1.1
ブリ	肉	11.8	—	—	…	…	
	肝臓	18.3	15,200	278,000	7,450	136,300	20
	幽門垂	51.7	395	20,400	16	830	25
	胃その他の内臓	12.2	38	460	22	270	1.7
	卵	3.2	1,710	5,430	…	…	
	眼	23.7	122	2,890	…	…	
	頭（眼を含まず）	11.8	…	…	57	668	
イナダ	背肉	6.6	…	…	…	…	
	腹肉	8.1	…	…	7	53	
	肝臓	9.3	1,470	13,600	636	5,880	2.3
	幽門垂	12.5	4,230	52,900	12	150	350
	腎臓	4.2	684	2,570	…	…	
	その他内臓	3.8	624	2,600	…	…	
	廃棄部	13.3	…	…	47	630	
カレイ	肉	2.5	29	73	24	60	1.2
	内臓	1.7	—	—	68	116	
	廃棄部（白子，肝臓を含まず）	3.5	38	133	…	…	
ヒラメ	肉	0.2	…	…	222	43	
	肝臓	1.4	569	787	3,100	4,280	0.2
	卵	2.1	…	…	90	193	
	その他内臓	1.2	3,080	3,700	600	720	5.1

… Dが検出されなかつたもの　　— 測定せず

1)　6種の魚を肉，内臓，骨，頭などの部分に分けその各部のDを定量した結果サバ，ブリ，イナダ，ヒラメのように肝臓にもつぱらDを蓄積する群とイワシのように肉に比較的大量のDを含みその含量が内臓のD含量とあまり変わらないものがある．アジ，カレイのようにDの少ないものもある(表10)．

2)　紫外線照射にたいして不安定といわれるDがサバ干物においてそうとう多く含まれていることは興味深い．またフィッシュソリュブルにもかなり多量のDが検出された(表11)．

3)　ビタミン油のばあいはサメ類の分子蒸溜油をのぞきDが検出された．サメ類の分子蒸溜油にDが認め

表 11　水 産 加 工 品 中 の D 含 量

試料名	部分名	含油量(%)	A (I. U.)		D (I. U.)		A/D (I. U.)
			油1g中	試料100g中	油1g中	試料100g中	
サバ干物	肉	27.4	2	55	9	247	0.2
	廃棄部	14.4	8	110	19	270	0.4
フィシュソリュブル		8.4	965	8,100	431	3,620	2.2
〃 (N社)		10.0	7,180	71,800	750	7,500	9.6
〃 (T社)							

られなかつたのはヨシキリザメ肝油の例にみるように元来サメ類肝油にDが少ないうえ蒸溜中にDが破壊されるためと考えられる(表12).

5) A単位とD単位の比較よりあきらかなようにAの高いものが必ずしもDは高くなくA, Dがともに脂溶性ビタミンであるのにかかわらず魚体内での蓄積機構がことなるものと考えられる.

考　　察

従来報告されているD定量法は薬剤中のDにて適用されたばあいかなりの成功をみているが, これを食品に適用したばあいには良好な結果は得られていない. また水産物に適用し得ると報告されているものも, 肝油について適用しているだけで, その他の組織などのDを定量した例はない. この点, 著者らの方法は魚体各部のDのみならず下物, フィッシュソリュブルのようなもののDまで定量できる特徴がある. しかし著者らの方法といえども卵などに適用したばあいにはD画分の波長 480mμに呈色の吸収極大を有する Chromogen がくることがあり, D含量が低いときには正確には定量できないことになる. またイナダの肝臓に適用したばあいD画分の直前に500mμに呈色の吸収極大を有するChromogen[*9]があつた. Dの $SbCl_3$ による呈色が橙黄色であるに反しこの Chromogen のそれが桃色なので区別しうるが両者の吸収曲線がよく似ているので注意を要する.

これらの点は今後の問題点であるが水産動物脂質の不ケン化物成分が十分究明されていない現状にあつてはなかなか解決困難と思われる. 著者らもあるばあいには尿素附加反応などの効果をみとめた普遍的な方法として採用できるとはかぎらない.

また総Dとして200I.U. を含む試料10g をケン化し本法を適用したばあい波長500mμにおける Optical density は約 0.1 となるはずであり, これより単位の低い試料では Optical density が低くなるので定量値がやゝ不正確になることはさけられない. そこで, この定量限界をひろげるためには $SbCl_3$ 試薬で発色させるさい $CHCl_3$ で希釈することをせず直接セル中にとれば定量にかゝる最少D量を 1/3 程度にすることができ, さらに内容液量が少量ですむミクロセルを使用すれば10g中10I.U. 程度のDも正確に定量しうる.

表12　ビタミン油中のD含量

試料名	A (I. U.)	D (I. U.)	A/D (I.U.)
大ザメ蒸溜油	89,700	—	
メヌケ肝油	83,000	978	85
カジキ蒸溜油	79,100	6,930	11
油ザメ蒸溜油	94,700	—	
ヨシキリザメ肝油	5,600	67	84

結　　論

理化学的方法でDを定量するばあいD定量を妨害する不純物は除去する必要がある. この方法として著者らは白土クロマトと段階的アルミナクロマトとを併用すれば, $SbCl_3$ 反応により正確にDを定量し得ることをたしかめた.

(昭36. 6. 16. 受理)

文　　献

1) Wolff : Z. Vitaminforsch. **1**, 277 (1938)
2) Ewing, Kingsley, Brown, Emmett : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **15**, 301 (1943)
3) DeWitt, Sullivan : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **18**, 117 (1946)

*9) D_2, D_3 の段階的アルミナクロマトの結果この画分にはDがこないことはあきらかである.

Eng. Chem. Anal. Ed. **15**, 301 (1943)
3) DeWitt, Sullivan. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **18**, 117 (1946)
4) Ewing. Powell. Brown, Emmett : Anal. Chem. **20**, 317 (1948)
5) Green : Biochem. J. **49**, 36, 45, 54, 232, 243 (1951)
6) Ewing, Schtadach, Powell : Anal. Chem. **26**, 1406 (1954)
7) 馬場：栄養学雑誌 **12**, 155 (1955)
8) 沼田：ビタミン **11**, 493 (1956)
9) 三輪：北海水産研 **15**, 42 (1957)
10) 沼田：ビタミン **15**, 24 (1958)
11) 小川・小林：ビタミン **19**, 549 (1960)
12) 渡辺・吉田・越智：ビタミン **20**, 205 (1960)
13) 藤田：ビタミン **21**, 65 (1960)
14) Wilkie, Jones, Kline: J. Am. Pharm. Assn. **47**, 385 (1958)
15) Emmerie, Eekelen : Acta Brev. Neerl. **6**, 133 (1936)
16) Mennier, Vinet : Bull. Soc. Chim. biol. **27**, 186 (1945)
17) Plack, Kon, Thompson : Biochem. J. **71**, 467 (1959)

油脂の加熱による性状の変化と栄養価の変化（第2報）

Studies on Characteristic and Nutritive Changes of Oils during Heating (Part 2)

市販食用油を加熱した場合

In case that commercial oils were heated at 200°C for 12 hours

（昭和36年7月7日受理）

秋谷年見 (Toshimi Akiya)　石井清之助* (Seinosuke Ishii)
酒井寿江* (Hisae Sakai)　荒井君枝* (Kimie Arai)

To obtain the information about nutritive value of frying oils, commercial edible oils were heated at 200°C for 12 hours and both the physical and chemical characteristics and nutritive values were investigated.

Characteristic changes were rather slow until an elapse of 9 hours' heating, though remarkable changes were found after 12 hours' heating. Among the items tested, the change of viscosity was most remarkable. As heating time was increased, viscosity increased and viscosity index decreased.

Different results were obtained about nutritive value of different kinds of heated oils. Both heatd soy bean and rice bran oils were as nutritive as respective original oils, while rape seed oil lost its original nutritive value by the heating.

まえがき

著者の一人は，さきに，油脂またはエステルを200°C前後に2時間加熱した場合，その栄養価はほとんど低下しないことを報告した[1]。しかし，われわれが日常天ぷらなどに使用している食用油は，大豆油のみではないし，また加熱時間も2時間に限ったのでは，やや短かすぎるきらいがある。そこで，実際的な立場に立って，普通に天ぷら油に用いられている大豆油，米油，ナタネ油，ラードについて，200°Cに12時間まで加熱し，性状と栄養価がどう変化するかを調べた。

この報告は，上記の目的にそって行なった実験の結果を述べたものである。その結果をひと言で述べるならば，大豆油と米油はこの程度の加熱では栄養価を低下することはないが，ナタネ油では若干栄養価の低下を示した。

実験の部

実験 1. 市販食用油を200°Cに12時間加熱した場合の経時的な性状の変化

市販大豆油，米油，ナタネ油，ラード（いずれも工場から取りよせたもの）を500mlの三角フラスコに300gずつ取り，油浴中で200°Cに温度を保ちながら12時間加熱した。この場合，試料が直接空気にふれる面積は約50cm²であった。一定量の試料を3時間ごとにとり，比重，屈折率，酸価，泡立ち，粘度，吸収曲線を測定した。比重は比重瓶により，屈折率はアツベの屈折計により，沃素価は臭化ピリジン法によった。また泡立ちの測定は東・金子法[2]に準じた。ただし，濾紙は直径7cmのものを用い，浸ませる水の量は0.7ccとした。粘度は，一定の恒温槽の中で，オストワルドの粘度計を用いて測定し，次式から粘度指数を算出した[3]。

$$VI_2 = \frac{L_2 - S_2}{L_2 - H_2} \times 100$$

VI_2　粘度指数
S_2　37.7°Cにおける試料の運動粘度
L_2　98.8°Cにおける試料の運動粘度に対応するL系列の37.7°Cの運動粘度
H_2　98.8°Cにおける試料の運動粘度に対応するH系列の37.7°Cの運動粘度

また，試料の吸収曲線は試料の50～100mgを100mlの精製ヘプタンに溶解して測定した。これらの結果を第1表，第2表および第1図に掲げる。

第1表　加熱による食用油の性状の変化

油の種類	加熱時間	比重 b_{15}^{15}	屈折率 n^{40}	A.V.	I.V.
大豆油	原油	0.9225	1.4783	0.1	121.0
	3時間	0.9235	1.4783	0.2	120.4
	6時間	0.9231	1.4785	0.2	120.6
	9時間	0.9244	1.4788	0.2	119.5
	12時間	0.9268	1.4793	0.3	119.7
米油	原油	0.9147	1.4778	0.6	99.6
	3時間	0.9136	1.4780	1.0	98.4
	6時間	0.9156	1.4781	1.0	98.2
	9時間	0.9156	1.4782	1.4	97.2
	12時間	0.9207	1.4783	1.2	97.3
ナタネ油	原油	0.9145	1.4763	0.2	92.9
	3時間	0.9147	1.4765	0.2	92.3
	6時間	0.9153	1.4765	0.2	91.0
	9時間	0.9156	1.4771	0.4	90.3
	12時間	0.9192	1.4775	0.4	90.1
ラード	原油	0.8782	1.4755	0.1	55.9
	3時間	0.9961	1.4758	0.2	55.9
	6時間	0.8878	1.4759	0.2	55.9
	9時間	0.8891	1.4761	0.2	52.3
	12時間	0.8917	1.4765	0.2	45.1

第2表　粘度および粘度指数の変化

99°Cにおける粘度の変化

	原油	3時間	6時間	9時間	12時間
大豆油	8.08	9.58	9.60	9.75	10.82
米油	8.52	10.21	10.85	11.58	12.90
ナタネ油	11.48	12.68	12.32	12.18	12.23

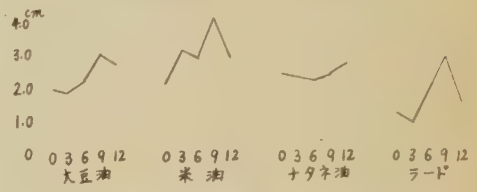
37.7°Cにおける粘度の変化

大豆油	26.58	28.12	29.18	29.40	31.02
米油	35.50	36.30	38.57	38.85	46.12
ナタネ油	43.04	46.95	47.68	50.02	52.05

粘度指数の変化

大豆油	184.4	183.4	181.3	181.1	179.1
米油	185.8	172.7	170.7	172.2	167.6
ナタネ油	256.1	205.5	165.2	162.9	161.1

第1図　泡立の変化



実験2，200°Cに12時間加熱した試料の動物試験

実験1において得た試料，すなわち200°Cに12時間加熱した大豆油，米油，ナタネ油およびラードを用いて動物試験を行なった。第3表のような組成を有する基本試料で，ねずみを数日飼育し，のち基本餌料8.5g，試料1.5gを投与し，体重増加をみた。各試料に対して，ねずみ4～5匹を割り当てたが，初体重の平均，生存率，6週間後の生存ねずみの体重平均，肝臓体重は第4表にかかげるとおりである。

第3表　基本餌料の組成

白米	79	マツカラム氏塩	3
カゼイン	15	酵母	3

第4表　動物試験の結果

	動物数	初体重平均	生存率	最終体重平均	肝臓／体重
大豆油	5 (♂3 ♀2)	65.4 (♂72.3 ♀55.0)	100% 100	126.2 (♂134.3 ♀114.5)	3.7%（3匹平均）
米油	5 (♂3 ♀2)	64.2 (♂70.0 ♀55.5)	100 50	124.0 (♂131.0 ♀103.0)	5.2%（3匹平均）
ナタネ油	5 (♂2 ♀3)	63.3 (♂69.5 ♀58.3)	100 100	98.8 (♂136.0 ♀74.0)	4.8%（5匹平均）
ラード	4 (♂2 ♀2)	60.3 (♂66.5 ♀54.0)	100 0	138.0 (♂138.0 ♀0)	3.9%（2匹平均）
対照	4 (♂2 ♀2)	65.0 (♂71.5 ♀58.5)	100 100	115.0 (♂136.0 ♀94.0)	4.2%（2匹平均）

また，実験終了どきに健全に成長した雄の心臓部から2ml の血液を採取し，Schoenheimer-Sperry 法の改法[4]によって，血清中の遊離コレステロールおよび総コレステロール量を測定したところ，米油がもっとも低い値を示していた。

考　察

市販食用油を200°Cに加熱した場合，測定した項目のうちでは粘度の変化がもっともいちじるしい。ことに，37.7°Cにおける粘度の増加はいちじるしく，12時間加熱した試料の運動粘度の増加は，はじめの試料の30%におよぶものもある。この傾向は，99°C の場合もおなじようである。しかし，ナタネ油の粘度増加は特異的であって，99°Cにおける粘度増加は37.7°Cにおける粘度増加ほど顕著ではない。このことは，粘度指数に顕著にあらわれている。一般に粘度指数は，今回の実験の範囲内では，加熱時間の増加とともに減少していったが，ナタネ油の場合には原油の粘度指数がいちじるしく高く，しかも12時間加熱した試料の粘度指数は最低であった。

比重は，加熱時間が9時間までのものは，その増加が緩慢であったが，12時間加熱した試料では急増していた。屈折率は，加熱時間が増すとともに，徐々に増加していた。12時間後の試料では，はじめの試料より 0.0905～0.0011 増加していた。

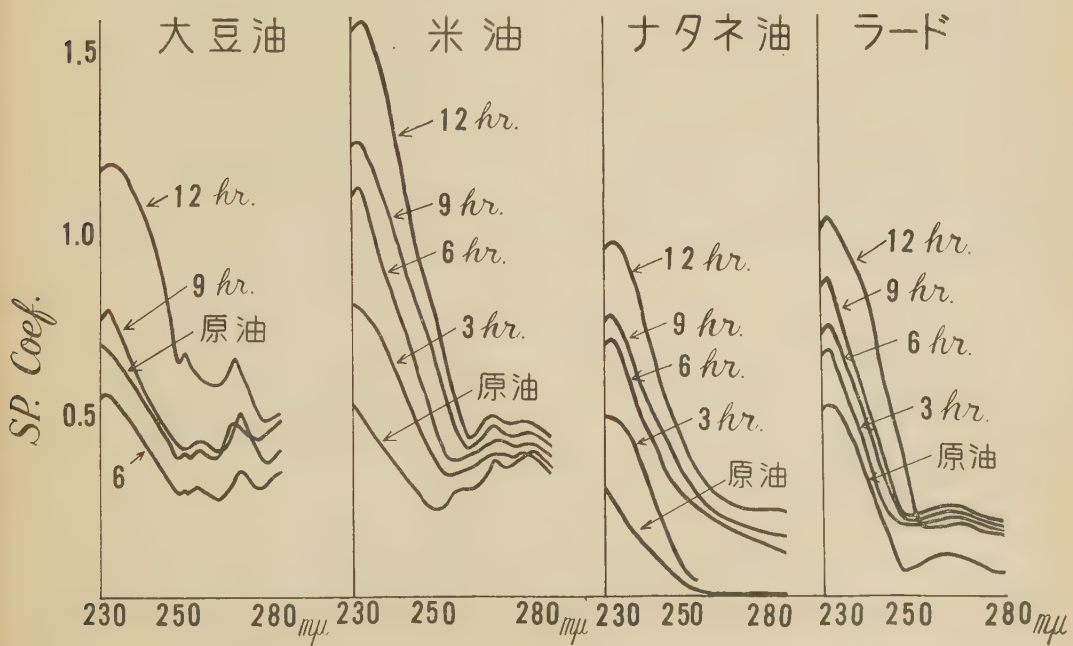
酸価は増加する傾向にあるが，その増加率はそれほど顕著ではない。沃素価は，時間とともに減少するが，植物油の場合の減少率はラードの場合の減少率ほどいちじるしくなく，12時間加熱した試料で，植物油では5%以下，ラードでは 10% 以上である。

泡立ちは，3時間加熱した試料では，原料と大差なく，それほどいちじるしくないが，9時間加熱した試料では，いちじるしく増加する。

吸収曲線をみると，植物油の場合，3時間加熱した試料では 232mμ 付近に吸収がないが，6時間加熱した試料では，吸収が現われてくる。米油の場合，加熱とともに 252mμ 付近の谷が長波長側にずれてゆくが，大豆油の場合には，こうした傾向はない。そのかわり，253～258mμ の間に小さな山が現われてくる。ラードでは，はじめから 232mμ 付近に小さな山があった。このことは，ラードが製造の過程において，すでに共役酸が生成されていたといってよいと思う。

生長試験の結果からみると，大豆油は♂，♀ともに順調に発育し，毒性を示す兆候はまったく見られず，栄養価が低下するという兆候はなかった。米油も，おおむね順調な生長を示したが，♀の一匹が25日目を最高として，それから体重低下をきたし，35日目に死亡した。ナタネ油は6週間後の体重増加は前二者の約60%であり，ことに♀にあっては32日目以後体重低下をきたし，目は充血し，体中の毛は立ちあがり，病的な兆候を示した。6週間後に解剖してみたところ，胃および腸はやや黄味をおび，かつガスが充満していた。ラードでは，♂は順調な生長を示したが，♀では14日目から体重減少をきた

第2図　加熱による植物油の吸収曲線の変化



し，22日目には，ことごとく死亡した。

試料の過酸化物価は，加熱直後においては，問題にするほど大きな値を示さないが，時日の経過とともに再び生成されるおそれがある。そこで，動物試験終了後また過酸化物価を測定したところ，大豆油 13，米油 30，ナタネ油 23，ラード 70 であった。植物油に比較して，ラードの過酸化物価はかなり高かった。

つぎに血清中のコレステロール含量をみると，遊離コレステロール，総コレステロールともに米油が他の三者より低くかった。実験の範囲では，ラードと大豆油とでは大差がなかったが，R. B. Alfin-Slater[5] らの得た数値にくらべると，非常に高かった。しかし実験例が少なくないので，断定的な結論をくだすためには，さらに実験をくりかえす必要がある。

む す び

市販食用油を200°Cに12時間加熱し，経時的な性状の変化をしらべるとともに，その加熱油の栄養価を動物試験によって検討した。性状の変化は，9時間までは緩慢であったが，12時間目の試料ではかなりの変化がみられた。そのうちで，粘度の変化がもっともいちじるしく，加熱時間の経過とともに増大した。粘度指数は逆に減少した。

栄養価は油脂の種類によって，異なる結果を得た。大豆油はもっともよい結果が得られ，栄養価の低下または毒性を呈する兆候はまったくなかった。これに反して，ナタネ油では，時日の経過とともに病的な兆候を示し，栄養価の低下がみられた。米油は，それほどの栄養価の低下はなかったが，ラードでは，なお実験を重ねる必要がある。

ナタネ油がなにゆえに毒性を示すかについては，さらに研究を行なう必要がある。

文 献

1) 秋谷：本誌，**14**，71 (1961)
2) 東，金子：日水誌 **16**，505 (1950)
3) 潤滑油の粘度および粘度関係諸表 p. 59
4) Sperry & Webbs et al; *J. Biol. Chem.* **187**, 97 (1950)
5) Aefin-Slater et al; *J. Nut.* **62**, 129 (1957)

（農林省食糧研究所）
＊東海区水産研究所

高コレステリン血症とナイアシン

高コレステリン血症の患者66人に，毎日1.5～6gのナイアシンを経口的に与えた。そのうち51人は，1年間以上投与を続けたが，40人は，投与前の値327mg/dl に対して，250mg/dl 以下に低下した。同時に，血漿中，脂肪酸量およびコレステリン燐脂質の比の値も低下した。

冠動脈および末梢動脈不全に対するナイアシンの効果は認められるが，動脈硬化の諸症状に対しては臨床的な効果は認められず，ナイアシン治療中または治療後に，動脈硬化症で死亡した人は11人におよんだ。

副作用として，胃腸障碍，皮膚発赤，肝機能障碍，耐糖力低下，高尿酸血症，稀には黄疸があらわれることがある。

これらの作用の機構は不明である。

Hypercholesteremia and Nicotinic Acid
KENNETH G. BERGE et. al
The Amer. Jour. of Med. **31**, 24 (1) (1961)

（小 池）

原　報

イシナギ肝臓を原因食とする中毒症状の観察[*1]

新間弥一郎[*2]　田口　脩子[*2]

A Symptomatic Observation of the Intoxication Caused by Liver of "Ishinagi" (*Stereolepis ishinagi*)

Yaichiro SHIMMA, Hisako TAGUCHI
(from the Tokai Regional Fisheres Research Laboratory)

Since old days, many cases of poisoning due to eating liver of "Ishinagi" fish have been reported in this country, which can be featured by early onset of severe headache followed by peeling of skin. In addition, the liver of "Ishinagi" has been well recognized for its surprisingly high vitamin A potency.

1) Vitamin A potency and varieties of fatty acid were examined for several lot of liver oil extracted from three different livers of "Ishinagi" (Fig. 1 and Tables 1 and 2).
2) In the feeding tests for the first two samples of liver, there was found no toxic effect for rat and even for human subject by those such as cooked liver, oil fraction, and residual portion from oil, so far the amount shown in Table 3.
3) In a test conducted for No. Ⅲ liver, which contained 261×10^3 I.U. of vitamin A in 1 g of the tissue, toxic effect except by hypervitaminosis could be observed for neither oil nor extraction residue, by feeding those two separately for rat and the residue for man.
4) The four male volunteers who had eaten each 8 g of cooked liver of No. Ⅲ, equivalent to $1,500\times10^3$ I.U. of vitamin A, suffered from headache and a slight peeling of skin which lasted for about one month. (Fig. 3 to 5).

According to the present examination, liver of young "Ishinagi" (Ⅰ and Ⅱ) contained vitamin A less in the quantity and would be scarcely toxic. However, as to the adult liver of No. Ⅲ fish, it indicated high amount of vitamin A, and furthermore, it seemed to contain any other poison, which supposedly developed peeling of skin as an after-effect of the intoxication.

(Received December 22, 1960)

外国においては，種々の動物肝臓を原因食とする食中毒に関する報告[1]が多いが，それらの原因となった肝臓はビタミンA（以下Aとする）含量の高いものに限られていること，またその中毒症状がAの急性過剰症に，きわめて類似していることなどから，このような食中毒はA過剰症によるものであろうと考えられてきた．

わが国において報告されている，このような中毒事件は，クジラあるいは魚類の肝臓を食した場合であるが，そのうちで，特にイシナギ肝臓はしばしば激しい中毒を起こすので有名であり，古書にも此魚肝に毒あり，イシナギの鮨を食し，その毒にあたり瘡腫を発し皮脱落するとある[2]．また最近数年間に東京都下に発生したイシナギ肝臓を原因食とする中毒事件については，東京都衛生局の詳細な調査があるが，これによれば，そのおもな症状は次のとおりである[3]．すなわち潜伏時間は30分～12時間位で1時間，7時間前後をピークとし発病率は 100

*1　東海区水産研究所業績　B第344号
*2　東海区水産研究所

%で激しい頭痛，嘔吐，発熱，顔面の浮腫が起る．しかし最も特徴的な症状は，第2[illegible]日目頃から始まる皮膚の落屑で，毒性とみられるものである．軽症，局部などの局所性限局落屑にとどまるが，重症の場合には落屑はかなり大きく，ある者は顔面の剥離しかかった皮膚がガサガサ音をたてるほどであり，範囲も全身に拡がり，第20～30病日をもって終了する．このように人間における中毒症状については，きわめて詳細な記録があるにもかかわらず，有毒物質の本体については，ほとんど研究がなされず，人間以外の他の動物がイシナギ肝臓を食した場合に中毒症状が発現するか否かも明らかでない．しかしイシナギ肝臓は往々きわめて大量のAを含有することが知られているので，従来は単に肝臓中のAに起因する中毒症状であろうといわれてきた．

最近著者らは，東京都市場衛生検査所のご好意により，築地市場に入荷した3尾のイシナギから，それぞれの肝臓を試料として入手し得たので，その毒性についてシロネズミおよび人間について試験を行った．その結果A含量の高い肝臓を食した場合はイシナギ特有の中毒症状が現われ，少量の摂取量にもかかわらず，皮膚落屑は長期にわたり，その症状の激しさは純粋のAによる過剰症のみとは断定し難いように思われた．

本報においては，これら供試肝臓中脂質の分析結果および有毒肝臓を食した場合に，現われる中毒症状について観察した結果を報告する．

実験の部

I 試 料

3個の試料のうち，試料IおよびIIは全肝臓を，試料IIIはその一部を入手した（Fig. 1）．各々の魚体，肝臓についての記録および肝臓中油脂成分についての分析結果を Table 1～2 に記した．

Fig. 1. Liver of "Ishinagi" (*Stereolepsis ishinagi*)

A) Liver I Surface view　　B) Liver II Reverse side view

Table 1. 試料の性状

Livers of *Stereolepsis ishinagi* (black sea bass)

Sample No.	Landed place and date	Body weight	Liver weight	Liver wt. / Body wt.	Liver oil			
					Oil content of livers	Vitamin A potency of liver oil	Unsaponifiables	Sterol content of unsaponifiable
I	Not recorded 26, Jun. 1960	11kg	230 g	2.1%	18.0%	446×10^4 IU	9.8%	30.7%
II	Habu, Oshima 31, July 1960	23	370	1.6	28.0	10.2	7.3	34.6
III	Katsuura Chiba 6, Sep. 1960	62	1,000	1.6	22.3	117.0	49.6	20.2

Table 2. 供試肝臓中の脂肪酸の性状

Quality of Fatty Scids of the Liver Oil

Sample No.	Mixed fatty acid		Polyene concentrations of mixed fatty acids g/100g					
	Neutralization value	Iodine value	Hexaene	Pentaene	Tetraene	Triene	Diene	Total polyenes
I	208	135	17.4	5.3	5.4	5.0	6.2	39.7
II	203	114	8.4	3.4	3.4	3.3	3.0	21.5
III	209	68.5	3.6	1.8	1.2	1.6	2.7	10.9

この結果から明らかなように，試料IおよびIIと試料IIIとの間には，著しい相違があり，前2者が若年魚の肝臓でA濃度が低いのに反し，後者は比較的魚体も大きく，肝臓は多量のAを含有していた．またA濃度の高い肝油では，脂肪酸のヨウ素価が低く，高度不飽和酸量が少いことが認められた．

II 試料IおよびIIの動物試験

1. 肝油の分離 試料IおよびIIについては，まず肝臓50gを細切し，同量の水を加えてミキサーにかけたのち，ビーカーに移す．沸騰浴中で，内容物が90°に達してから，10分間加温したのち，吸引沪別して沪液と残留物とに分離する．残留物は毎回ベンゼン250 mlを加えすてかきまぜながら，3回加温抽出を繰返し，脂質を抽出する[4]．抽出ベンゼン液を集め，遊離の脂肪酸を除去してから，溶剤を留去し，それぞれ10.2gおよび10.0gの抽出油を得た．最初に分離した沪液には，油滴の浮上が認められるので，同量のベンゼンを加えて一回振り混ぜ油層を回収した後，水浴上で濃縮して肝臓エキスを得た．

2. 毒性試験 試料IおよびIIから，このようにして得られた抽出油，抽出残留物および肝臓エキスの各部分について，シロネズミを用いて試験した結果，何ら毒性を認めなかったので，さらに肝臓自体を調理して，人間およびシロネズミに対して，Table 3に記した投与量をもって試験したが，この程度の量では，何ら中毒症状を認めることができなかった．

III 試料IIIの動物試験

1. 肝油の抽出 肝臓15gを細切し，これにベンゼンを加え加温し，ベンゼンと共に蒸留する水分を可及的に除去しながら，3回抽出を繰返し，抽出油と抽出残留物とを得た．

2. 毒性試験 2匹のシロネズミに，乾燥した抽出残留物を4gずつ投与したが，異常を認めず，人間が1g摂取しても何ら自覚症状はなかった．抽出油はそのA濃度を計算して，2群のシロネズミに体重g当り1日500 IUおよび850 IUを3日間連続経口投与すると前者は異常なく，後者には軽度の典型的A過剰症を起こすに留まり，その他の毒性は認めなかった．従ってイシナギ肝臓を抽出油と抽出残留物とに分離すれば，そのいずれの部分にも，A以上に毒性の強い物質は存在しないことが明らかとなった．

IV 試料IIIによる食中毒

試料III肝臓自体を次のように処理した後，人間について試験した結果，特異の中毒症状が現われることを認めた．

1. 処理方法 各20gの小片3個を切りとり（Fig. 2 A），切り目を入れ，水300 mlにひたし，蒸し器中に入れ加温する．水温75°に達してから10分間持続すれば，著量の油が浮上する．浮上油は5.2gで油中A濃度は112万IU/gであった．肝臓片をとり出し，再び秤量すると37g

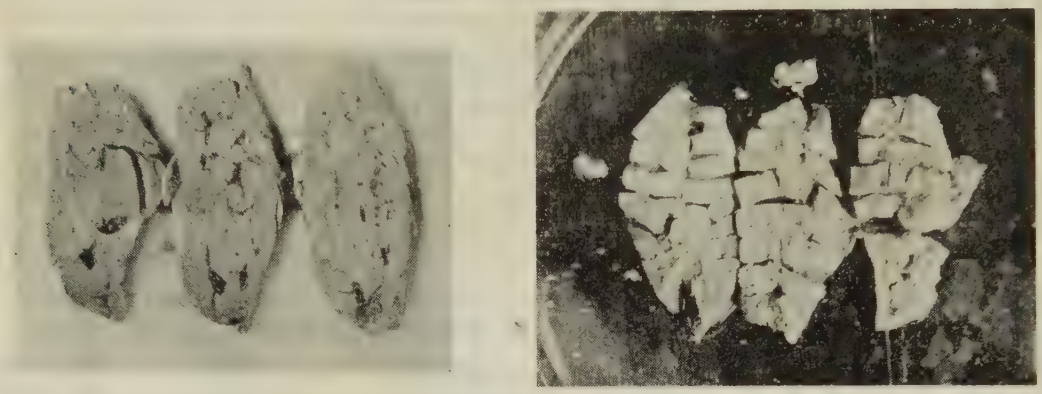
Table 3. 若年魚肝臓の動物試験結果

Amounts* of Samples Used for Animal Tests (Liver I and II)

Sample No.	Animal used	Dried liver after extraction of oil	Liver oil	Water extract	Cooked liver
I	rat	4g	1 ml, 2 ml	Concentrate made from 50g of liver	10g
	man	0.5g	—	—	10g each, to 5 persons
II	rat	5g	1 ml each, 3 days	〃	10g
	man	1g	—	—	5g

*All these parts showed no toxic effect

Fig. 2. Poisonous Liver III



A) Cross view　　B) After cut, cooked in 300ml of hot water for minutes

であった (Fig. 2 B). この肝臓片8gとあらかじめ玉ねぎ，しょうが，ひき肉，玉子を砂糖，しょう油，味の素で調理したもの32gとを油揚げにつめ，宝ぶくろの形として再び20分間加温した.

2. 中毒症状 このようにして作られた宝ぶくろを4人の男子 I (45才), K(35才), S(35才) および U (31才) がそれぞれ1個ずつを食した結果，全員に次のような経過でイシナギ肝臓中毒特有の症状が現われた.

第1日：14時30分 試食 (9月29日. 1960)

20時30分～21時00分 K，Sは顔面紅潮，きわめて軽いめまいを感ず.

21時00分～22時00分 I，K，Sは軽い頭痛. Uはやや激しい頭痛を感じ，鎮痛剤を服用するも効果なし. K，Uは僅かに呕吐あり，全員熟睡する.

第2日：朝 Iは軽い頭痛，S，Kは二日酔のような頭痛. Uはやや激しい頭痛があるが全員出勤し，軽度の仕事を行い得た.

午後 次第に治りUを除き他の3人はテニスを行うことができた.

第3日：朝 全員唇周辺から皮膚の落屑が始まる. (Fig. 3). 剃刀負けのような外観を呈す. 僅かに疲労感があり舌の触感が鈍い (S).

第4日： 皮膚落屑は顔全体に拡がる. Sのみ食欲不振.

第5日： 顔の皮膚は薬品かぶれの感じを残す. 頭皮落屑はなはだしい. 唇に乾燥感がある.

第6日： 顔面の落屑はほとんど終る. 頭皮落屑続く.

第7日： 唇に乾燥感を残す以外ほとんど治癒す.

第11日： Iは手の甲に皮膚落屑始まる.

第19日： Kは肘の附近に皮膚落屑始まる.

第23日： Iの落屑部分は，次第に上部に移り肘に至る. Kは手首に，Uは手指の間に皮膚落屑を認める (Fig. 4).

第29日： Sは大腿部および腰部に皮膚落屑. I，K，U治癒す.

第38日： Iは足の甲および足首附近に皮膚落屑始まる (Fig. 5).

第42日： Uは同上，KおよびSは症状なし.

Fig. 3. Peeling of the skin, 45 hours later

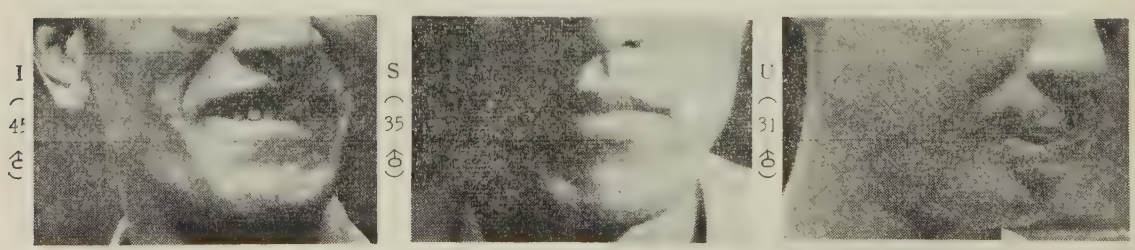
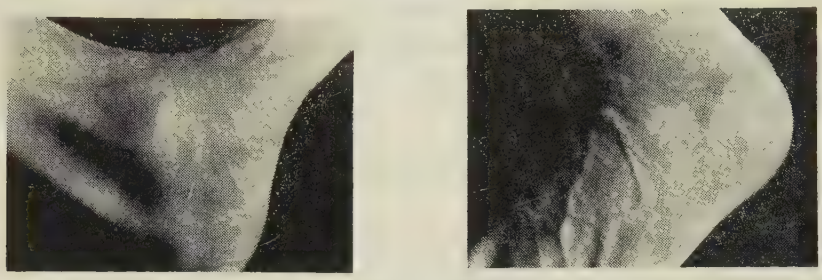


Fig. 4. 23 days later

Fig. 5. 38 days later



V 試料Ⅲによるシロネズミの中毒症状

試料ⅠおよびⅡの肝臓においては，相当鮮度の低下したものでも砂糖およびしょう油で調理して与えると，シロネズミは好んで食べてしまうが，試料Ⅲの肝臓ではほとんど食べようとしない．また調理後しばらく放置すると，次第にAの酸化臭が強くなり，ますます摂餌しない．従って試験前には，20時間絶食させた後試料を与えて毒性を観察した．

投与試料

(1)試料A： 人間が試食したものと同一試料すなわち多量の水中で加温した肝臓実質（含油量18.2%，油中ビタミンA濃度は105万 IU/g，従って試料1 g中A量約19万 IU）．

(2)試料B： 肝臓8 gを細切し80mlの水を加え，沸騰浴上で80°に達してから10分加熱した後，乳ばちで充分すりつぶし，再び5分間加熱した．これを遠心分離（毎分10,000回転，20分間）し，沈殿物約5 gを得た（含油量14.8%，ビタミンA濃度111万 IU/g，従って試料1 g中A量16.4万 IU）．なおこのとき分離した浮上油は0.97g油中A濃度は113万 IU/g であった．

試験結果

(1)試料A： 体重170 g の♀シロネズミに，試料5 gを与えたが約0.5 g を食べ残した．第2日から激しい下痢および脱毛が始まり，両眼に出血を認め，第6日目にはほとんど両眼がつぶれたが，第8日目頃から次第に回復した．第15日には眼球の中央部が激しく突出し，また数か所に1 cm² 程度の完全に，脱毛した部分を残す以外はほとんど治癒した（Fig. 6）．第30日頃から脱毛部分に再び発毛した．

Fig. 6. A poisoned rat by liver Ⅲ

A) 2 days later

B) 12 days later

C) 23 days later

(2)試料B： 体重59.5gおよび194.5gのシロネズミに，それぞれ2gずつを与えたが，前者は24時間で斃死し，後者は外観的には全く異常を認めなかった．また中毒したシロネズミは18時間後には下痢が始まり，しばしば大きく体をふるわせるのが観察された．

考　察

肝臓中のA量について　イシナギ肝臓中には，しばしば高濃度のAが含まれることはよく知られているが，魚体および肝臓とA濃度との関係についての報告例は少く，辻本[2]は体重100kg前後の10魚体から，それぞれ1～2.6kgの肝臓を得，油中のA濃度* 20～90万IUの肝油7～33%を得ている．その平均肝臓重量は1.53kg，平均含油量21.3%，平均油中のA濃度58.1万IUであった．東[5]は体重22kgおよび43kgの魚体から肝臓をとり，それぞれ含油量16.3%および19.2%，油中のA濃度10.8万および7.7万IUを測定し，必ずしもイシナギ肝油が，すべてA濃度が高いとは限らないと述べている．

著者らの分析結果もよくこれらの文献値と一致しているが，成魚の肝臓（試料Ⅲ）では，組織1g中に25万IUのAが存在するわけで，市販の肝油剤（150粒150円）1びん中には30万IUあるいはAD滴剤（15g 250円）1びん中には，75万IUのAが含まれていることと比較して考えるならば，まことに貴重な資源である．しかし到底食用とはなり得ず，東京都が本年6月以後食品衛生法によって，その食用を禁じたことは当然であろう．

また辻本は2例について肝油中脂肪酸を分析し，不けん化物量と高度不飽和酸量とが逆比的に増減するであろうと想像したが，著者らは不けん化物量よりは，むしろA濃度と関係があるものと考える．さきにシロネズミにおいて，過剰投与された大量のAがヨウ素価の低い脂肪酸とエステルをなして，肝臓中に蓄積されるのを観察したが（未発表），イシナギ肝臓においても，同様に大量のAが蓄積されるにつれて，高度不飽和酸の割合が次第に減少してゆくと考えるべきであろう．

イシナギ肝臓による食中毒について　イシナギ肝臓を原因食とする中毒症状は，その中毒潜期が長いことを除くならば，Knudson[1]の記載する急性A過剰症と全く同様であり，中毒原因が肝臓中に多量に含有されるAに起因することは，ほとんど間違いないように思われる．したがって，試料IあるいはⅡのように，A含量の低い肝臓でも，50～200gからAの摂取総量は約140万IUとなり，本実験の中毒例に近い値となるので，危険なものと考えられる．

成人における急性A過剰症は純粋のAでは，一時に何単位を摂取したときに，どのような[illegible]起こるかは明確でないが，乳幼児では20万IU，成人では100万IU以上は危険であろうとされている．したがって本実験における中毒例は，約150万IUのAを摂取したことになるので，過剰のAによる中毒と考えられるが，その症状がほとんど個人差無く，激しくかつきわめて長潜期にわたって現われることが，純粋のAアセテートあるいはパルミテートによる過剰症と全く同一かあるいは異なる点がある．もしイシナギ肝臓による中毒が，純粋のA（オールトランス型）によるよりも激しく現われるとすれば，A濃度の高い肝臓中には，純粋のA以外に何らかの物質が共存して，Aの毒性を強め持続させるのではなかろうか．

シロネズミに与えられたA量は，ネズミ体重g当りそれぞれ（試料A）5,000 IU，（試料B）5,500 IU，1,700 IUとなり，成熟したネズミでは1,700 IUで全く異常を現わさず，大量のAに対して人間よりもはるかに抵抗が強い．また組織1g中1万IUのAを含むイシナギ肝臓1kgを中形犬に与えて異常を認めない報告[6]があるが，犬もシロネズミ程度Aに対して抵抗力を有するならば，与えられたA量は中毒量よりはるかに低いものであったろう．このように大量のAに対して抵抗力の強い動物があること，また人間におけるイシナギ中毒の主症状が，頭痛や皮膚落屑にあることから，実験動物による毒性の判定は慎重を要するものと思われる．

摘　要

イシナギ肝臓による食中毒が，単なるA過剰症によるのか，あるいは他の特異な毒物によるのか検討するために，東京築地市場に入荷した3尾のイシナギの肝臓を試料とし，それぞれの脂質を分析したのち，人間およびシロネズミに対して，これら3個の試料から分離した抽出油，抽出残留物，肝臓エキスおよび調理した肝臓を与えた結果，シロネズミでは抽出残留物および肝臓エキスは

*原報の青価単位に380を掛けて求めた．

全く中毒症状を現わさず，抽出油中にはよりA毒性の強い物質を認めなかった．

人間では3個の試料のうち，含油量22.3%，油中のA濃度117万IUの肝臓を調理して食した場合に，皮膚落屑を伴う寺有の中毒症状が現われたが，摂取した肝臓中のA量から予想されたよりも，中毒症状は激しく，かつ長期にわたり，単なるA過剰症とは断定できなかった．

本研究を行なうにあたり，井関重雄，衣巻豊輔，杉井鱗三郎の諸氏のご協力を得，試料肝臓は市場検査所から提供された．また東秀雄，平尾秀一の両博士に終始ご懇篤なるご指導を賜ったことを併せて謹んで感謝する．

文 献

1) A. G. J. Knudson, P. E. Rothmann : Am. J. Diseases Children, **85**, 316 (1953).
2) 辻本満丸： "肝油の研究" 丸善株式会社 428 (1936).
3) 「イシナギ」の肝臓を原因食とする食中毒様疾患について： 東京都衛生局公衆衛生部獣医衛生課(1957).
4) 東秀雄，新間弥一郎，田口脩子： 日水産. **26**, 413 (1960).
5) 東秀雄； 農化. **17** 801 (1941).
6) 海沼勝； 食品衛生研究，**10** (11) 95 (1960).

牛乳中に含まれる細菌発育阻止物質（特に抗生物質）の鑑別検査法について

松井武夫*，佐野玲子*，赤尾頼幸*，神林三男*

T. T. C. Test with Resistant Strains to Antibiotics of Streptococcus thermophlus for the Detection of Germ-Inhibitory Substances (Antibiotics) in Milk

Takeo MATSUI, Reiko SANO, Yoriyuki AKAO, Mitsuo KANBAYASHI
(from the Institute of Public Health)

A method detecting and identifying the variety of antibiotics in milk was completed by T. T. C. test. After the cultivation of resistant strains to various antibiotics (penicillin, streptomycin, chloramphenicol and tetracycline) of Streptococcus thermophilus antibiotics in milk were identified by the crossed T. T. C. test using those in comparison with the sensitive normal strain.

Results of basic experiments carried out are as follows :

1) Each resistant strain to penicillin, streptomycin, chloromycetin, achromycin or terramycin respectively was obtained by means of raising streptococcus thermophilus in succession in each of skim milk culture substrates which were added severally with the gradually increasing amount of antibiotics. These resistant strains gave a coloration at the higher levels of antibiotics content compared with the normal strain.
2) Streptcoccus thermophilus showed different resistances according to the kind of antibiotics, but the resistant strain to terramycin and the one to achromycin showed crossed resistance each other.
3) The differences of resistance caused by the variety of antibiotics were stabilized by making use of the limiting dilution method.
4) When samples were heated at 85°Cfor 5 minutes in the T. T. C. test, no antibiotics were affected.

Judging from the results of our basic experiments as mentioned above, we think this method is practically applicable to the identification of antibiotics in milk.

* 国立公衆衛生院衛生獣医学部 (Received January 10, 1961)

天然ニジマスの脂質について

新間弥一郎・田口脩子

(1961 年 11 月 9 日受理)

STUDIES ON LIPIDS OF WILD RAINBOW TROUT

Yaichiro SHIMMA* and HISAKO TAGUCHI

Fish culture industry for *Salmo irideus* GIBBONS has made a rapid progress with export of the frozen products increasing at such a rate as from 323 metric tons 1955 to 955 tons in 1958. Little information, however, is available at hand in regard to chemical properties of lipids of this species. The authors have carried out a survey on the lipids of wild rainbow trout with an expectation that the data would be useful in improving the method of procesing and the feed in culture for this fish.

The fish used were caught by a gill net in Chuzenji Lake on May 27, 1961, and transported with ice to our laboratory in Tokyo. Body length, weight of the samples, and their visceral organs were examined (Table 1). Lipids were extracted respectively from liver, kidney, pyloric caeca, head, fatty tissue in abdominal cavity, and edible portion. Unsaponifiable matter was separated from fatty acid (Table 2 and Fig. 1). Mixed fatty acid of each portion remained within the range from 142 to 155 of iodine value and from 1.4600 to 1.4630 of reflex index at 40°C. As far as saturated and unsaturated acids concerned, however, liver oil was found to be different in composition from oil of other parts (Table 3 and Fig. 3). Among the samples from neck, middle, and tail regions of the dorsal muscle, the middle had a higher oil content, the oil being lower in reflex index that from other body parts. No positive relation, however, could be observed between the oil content and iodine value of the oil for any corresponding part of the muscle, for the latter varied from 105 to 137 according to a region as well as to the individual fish examined (Table 4 and Fig. 4).

ニジマスの養殖事業は，その冷凍製品の輸出の伸長とともに近年次第に盛んとなり，全国各地で広く行なわれるようになつてきた。しかし，わが国においては養殖餌料の化学的研究はあまり省りみられず，養殖魚の風味が天然魚や外国産のものに劣るといわれる原因，あるいはふ化から養殖過程における異常斃死の問題など多くの解決すべき点が残つている。これらの問題は餌料中の脂質にも関係があるものと考えられるが，現在まで餌料やニジマスの脂質についての研究は極めて少ない。

最近，脂質中の色素やビタミン A・D の定量などがなされつつあるが，ニジマスの脂質について煮取油の特徴を 1917 年に辻本[1] が報告している以後はわずかに含油量についての測定が報告されたに過ぎない[2),3)]。よつて著者らはその養殖餌料の改善や加工製品の向上に資する目的からニジマス中の脂質成分を詳しく知る必要を感じ，天然魚について体各部の脂質の性状を分析したので，その結果を報告する。

試料および実験方法

水産庁日光養鱒場の協力によつて，昭和 36 年 5 月 27 日，中禅寺湖に前夜設置した刺網にかかつたニジマス 10 匹を早朝採集し，氷とともに箱詰し東京月島の東海区水産研究所に運び，直ちに −20℃ のフリーザ中で凍結した。翌々 29 日にいちおうすべての魚体および臓器の秤量を行なつたのち，個々に順次脂質

東海区水産研究所業績 B 第 363 号

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab. Chuō-ku, Tokyo, Japan).

の分析を進め，7月末日にすべて終了した。この間試料は −20℃ に保存した。

脂質を抽出するには肉，肝，腎，幽門垂については4倍量の脱水芒硝を，腹腔内脂肪には同量の脱水芒硝を加え，乳鉢中で充分混和したのち，エーテルで5回繰り返えし抽出した。可食部および頭部はベンゾール中で加温し，ベンゾールとともに蒸留する水分を可及的に溜去しつつ3回抽出を繰り返えした。

脂質の沃素価は臭化ピリヂン法により，不鹸化物中のステリン量はジギトニン法によつてそれぞれ測定した。

脂肪酸の分析は鉛塩アルコール法により固体酸と液体酸とに分離したのち，液体酸を 21% KOH グリコールで 180℃, 10 分間加熱して異性化[4] を行ない HOLMAN[5] の計算式により不飽和酸量を求めた。

実験結果および考察

I. 魚体および各臓器重量

試料ニジマスの体長，体重および臓器重量を Table 1 に示した。この結果，体重 427g～1,230g の供試試料においては肥満度は平均 21.5 となるが ♂ の1例のみが 31.5 と極めて高い値を示した。体重に対する肝および腎の平均重量比はそれぞれ 1.32% および 1.02% で，標準偏差は 0.120% および 0.137% となり，体重が増加してもこれらの重量比はほとんど変化しないようである。腹腔内には多くの脂肪組織がありとくに幽門垂の房状組織の間などに多いが，これらを分離することは困難なので，容易にとりうる部分だけを集めて腹腔内脂肪の秤量に供したので，正確な脂肪組織の重量を示してはいない。胃の内容物中には貝殻や小石などが見出された。全内臓の体重に対する割合は約 12% を占める。

Table 1. 魚体および臓器重量
Measurement of body and anatomical part of the samples.

試料番号 No.	性別 Sex	体長* Body length	体重 Body weight	肥満度 $W/L^3\times1000$	肝臓 Liver 重量 Weight	肝臓 Liver LW/BW	腎臓 Kidney 重量 Weight	腎臓 Kidney KW/BW	その他の内臓 Other viscera 腹腔内脂肪 Fatty tissue	その他の内臓 Other viscera その他 Others	その他の内臓 Other viscera 重量比 Per BW
		cm	g		g	%	g	%	g	g	%
1	♀	39.3	1,230	20.3	15.4	1.25	10.4	0.846	21.4	93.5	9.34
2	♀	36.6	1,020	20.8	13.4	1.31	9.3	0.912	11.1	110.8	12.0
3	♀	35.6	962	21.3	11.4	1.19	10.2	1.06	8.9	72.4	8.45
4	♂	35.7	1,010	22.2	15.2	1.50	11.9	1.18	25.2	84.2	10.8
5	♀	35.5	882	19.7	12.6	1.43	9.5	1.08	4.5	75.1	9.03
6	♂	31.5	985	31.5	13.4	1.36	10.0	1.02	12.3	77.1	9.08
7	?	36.5	965	19.8	10.9	1.13	8.4	0.870	13.4	76.1	9.27
8	?	30.5	578	20.4	8.7	1.51	4.8	0.830	12.3	54.2	11.5
9	♀	29.1	500	20.3	6.5	1.30	6.2	1.24	5.6	36.6	8.44
10	?	28.6	427	18.3	5.4	1.26	4.8	1.12	3.4	30.2	7·87
平均値 Mean value				21.5	1.32		1.016			9.58	
標準偏差 Standard deviation				3.48	0.120		0.137			1.31	
変化係数 Coefficient of variation %				16.2	9.1		13.5			13.7	

* 尾鰭の長さは含まない。 Excludes caudal fin.

II. 抽出油の性状

各臓器および頭部の脂質は試料1から5までを併せて抽出し，可食部の脂質は試料1および2から別々に求め，分析結果を Table 2 に示した。

すなわち，腹腔内脂肪組織は含油量 82% でもつとも高く，ほとんど貯蔵脂肪からなると思われる。これ

Table 2. 抽出油の性状
Properties of extracted oil.

部分 Part*	抽出油 Extracted oil				不鹸化物 Unsaponifiable matter			混合脂肪酸 Mixed fatty acid		
	収量 Oil content of tissue	屈折率 n_D^{40}	酸価 Acid value	沃素価 Iodine value	収量 Content in oil	不鹸化物中ステリン量 Sterol content	組織中ステリン量 Sterol of tissue	屈折率 n_D^{40}	中和価 N.V.	沃素価 I.V.
	%				%	%	mg/100g			
肝 Liver	9.98	—	—	—	11.2	69.6	777	1.4610	207	142
腎 Kidney	5.63	—	—	—	9.45	68.7	365	1.4630	220	155
幽門垂 Pyrolic caeca	29.8	1.4711	18.3	142	0.71	—	—	1.4610	213	154
腹腔内脂肪 Fatty tissue in abdominal cavity	82.0	1.4680	4.22	139	0.54	—	—	1.4610	209	147
頭 Head	20.5	1.4725	3.16	140	1.32	48.1	130	1.4610	216	152
可食部 Edible portion of Sample-1	17.3	1.4730	—	—	0.82	69.0	97.9	1.4620	202	145
〃 -2	14.2	1.4715	1.6	134	3.05	4.96	21.5	1.4600	218	142

* Except for the case of edible portion, each organ was collected from Samples Nos. 1, 2, 3, 5 and 7.

につづいて脂肪の付着している幽門垂が 29.8%，次に頭部が 20.5% と高い。屈折率は色素含量の少ない腹腔内脂肪が低く，1.4680 で，その他の部分では 1.4711～1.4730 である。抽出油中の不鹸化物量は含油量の低い肝，腎がそれぞれ 11.2%, 9.45% と他に比してはるかに高い。Fig. 1 に両者の紫外部吸収を示したが，V·A 量は見掛けで計算すると抽出油 1g 中，腎で 176 I.U.，肝で 2,350 I.U. となる。不鹸化物中のステリン量は試料 2 の可食部が 5% と非常に低い以外は体各部でだいたい 50～70% の範囲にある。

辻本[1] が群馬県丸沼津産の体重 448g, 500g の 2 尾の可食部からえた煮取油の分析値は比重 0.9229，鹸化価 198.1，沃素価 126，屈折率 (20℃) 1.4736 で，沃素価が著者らの結果 (III 参照) よりやや低い。

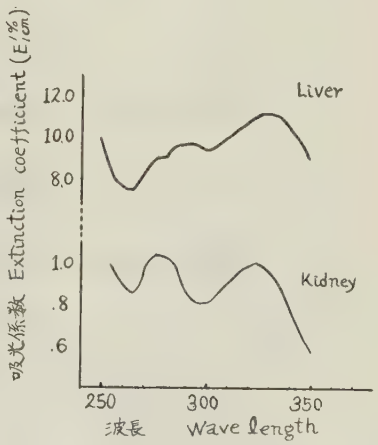


Fig. 1. 肝臓および腎臓不鹸化物の吸光曲線
Absorption curues of liver and kidney unsaponifiables.

III. 脂肪酸の性状

混合脂肪酸は屈折率 1.4600～1.4630，中和価 202～220，沃素価 142～155 の範囲にあり，体各部で大きな差違は認められない。深山[6] らもマスの頭部油，体油およびサケの体油，内臓油を分析し，いずれも部分によつては大差が認められなかつたと報告している。

また中和価がいずれも 200 以上で高いのは C 数 16 以下の脂肪酸含量が多いためと思われる。

肝，頭および可食部の混合脂肪酸を固体酸と液体酸とに分離し，両者の沃素価，中和価を測定した結果を Table 3 に示した。また，これらの液体酸および幽門垂，腹腔内脂肪の混合脂肪酸を分析して不飽和酸量を求め，各脂肪酸の重量割合を算出した結果を Table 3 および Fig. 2 に示した。

一般に淡水魚の脂質はオレイン，リノール，リノレン酸列に富むとされているが，ニジマスでもこれらの脂肪酸量は肝臓で 70%，その他の部分でだいたい 50% に達しているのが認められた。

肝臓の混合脂肪酸の沃素価は他とあまり変わらないが，固体酸は 8.45% で非常に少なく，また高度不飽

Table 3. 混合脂肪酸の分析結果
Separations and components of the mixed fatty acid.

混合脂肪酸 Mixed fatty acid	固体酸 Solid acid			液体酸 Liquid acid				混合脂肪酸中の不飽和酸含量 g/100g Polyene concentrations of the mixed fatty acid					
	収量 Yield	I. V.	N. V.	Yield	I. V.	N. V.	n_D^{40}	Hexance	Pentaene	Tetraene	Triene	Diene	Total Polyenes
	%			%									
肝 Liver	8.45	9.05	—	91.55	154	199	1.4630	9.70	5.04	6.50	6.41	4.12	31.77
頭 Head	24.2	20.4	227	75.8	181.8	213	1.4661	11.9	7.51	8.57	9.94	8.72	46.64
可食部 Edible portion (Sample 2)	23.5	7.2	236	76.5	176.8	212	1.4660	11.5	8.87	7.80	5.20	7.80	41.17
幽門垂 Caeca	—	—	—	—	—	—	—	8.5	6.4	9.2	13.3	8.8	46.2
腹腔内脂肪 Fatty tissue in abdominal cavity	—	—	—	—	—	—	—	13.7	9.8	8.2	3.6	8.5	43.8

In cases of liver, head and edible portion, liquid acid was used for the determination of polyene concentrations.

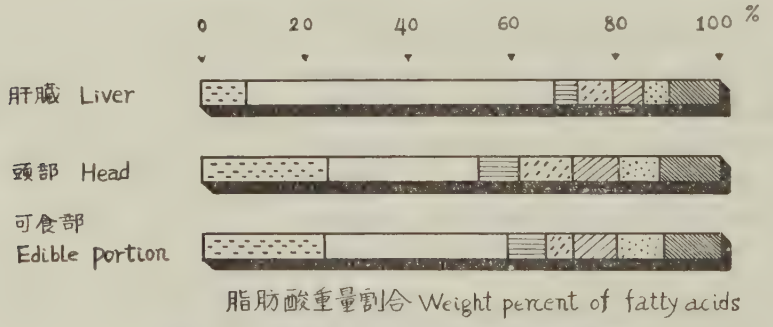


Fig. 2. 肝臓，頭部，可食部の脂肪酸組成
Fatty acid components of liver, head and edible portion.
Each pattern shows, from left to right, solid acid, mono-, di-, tri-, tetra-, penta- and hexadiene fatty acids.

和酸量も少なく，脂肪酸組成が他の部分とかなり違つている。

外山[7]がマス油脂肪酸の検索のさいに認めたと同様に，頭部から分離した固体酸 (Table 4 参照) もかなり高い沃素価を示しており，固体不飽和酸の混在が考えられる。

著者[8]らはさきに臭素化法によつて水産動物肝臓中の脂肪酸組成を求めたさいに，不飽和酸量が沃素価に比してはなはだ過少な値となることを述べたが，本実験では全体にポリエン酸の分析値が沃価素に比してやや過大な値となつているので，異性化法による分析についても，さらに検討を加える必要があると思われる。

IV. 脊肉中の脂質

さきに平尾[9]らはニジマス1尾の体各部における含油量とA量を求め，尾部が含油量低く，組織中A量がやや高いと報告したが，高橋[10]はカツオにおいて可食部脂肪の大部分が皮下脂肪層に含まれており，肉質中の脂肪は極めて少ないことを認めている。したがつて，ニジマス脊肉中の含油量をより正確に吟味するた

めに，脊肉の皮および脊骨に接する部分を充分厚くおとし，可及的に脂肪層の混入を防いだのち，頚部（I），中央部（II），尾部（III）の3部分から 20g づつ試料をとり，エーテルで脂質を抽出し分析し，結果を Table 4 に示した。すなわち，脊肉中の含油量は体重の大きいものでやや高く，5つの試料において 1.09～5% の範囲にある。中央部は1例を除いて他の部分より常に高い含油量を示し（1.85～5%），尾部はもつとも低く 1.09～2.9% にすぎない。(II)/(III) の含油量比を求めると5例においてそれぞれ 1.32, 1.73, 1.70, 2.39, 1.43 となり，平均値は 1.71，標準偏差は 0.372 となる。したがつて尾部の含油量はだいたい中央部の 0.58 程度となるわけである。頚部の含油量は尾部にほぼ等しいか，あるいはやや高く，試料 10 においては中央部より高い値を示したが，その他の試料ではすべて中央部よりは低い。

抽出油の屈析率は 40°C で 1.4690～1.4736 の範囲にあり，中央部は常に他の部分より低く，また部分差は個体差に比して比較的小さい。

沃素価は 105～137 で，その個体差は同一個体内の部分差も大きい。含油量と沃素価，あるいは部分と沃素価との間には一定の関係は認められず，例えば尾部の沃素価は中央部より高いものも低いものもあり一定しない。

Table 4. 脊肉中の脂質
Particulars of the lipid of dorsal muscle.

試料 Sample No.	部分* Region	含油量 Oil content	屈析率 n_D^{40}	沃素価 I.V.
1	I	3.06 %	1.4718	105
	II	3.50	1.4690	113
	III	2.66	1.4708	126
2	I	2.7	1.4729	136
	II	5.0	1.4715	137
	III	2.9	1.4730	134
5	I	1.44	1.4742	128
	II	1.85	1.4730	117
	III	1.09	1.4736	127
8	II	2.75	—	121
	III	1.15	—	—
10	I	2.16	1.4713	127
	II	2.07	1.4710	113
	III	1.45	1.4718	106

* I 頚部 Nape
II 中央部 Middle
III 尾部 Tail

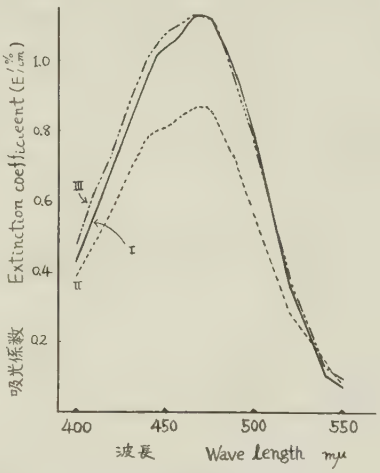


Fig. 3. 脊肉脂質の吸光曲線
Absorption curves of flesh lipid of Sample 1.
For notations I, II and III, see footnote of Table 4.

サケ，マス類の筋肉中色素については，すでにいくつかの研究[11,12]があるが，試料1の3部分の抽出油の吸光曲線を求めると Fig. 3 となり，吸光係数は頚部と尾部がほぼ等しく，中央部がやや低い。しかし含油量をかけて組織 100g 中の総量を求めると（$E_{1cm}^{1\%} \times$ Wt %）475mμ において 3.42, 3.01, 2.98 となり，頚部がやや高く，中央部と尾部はほぼ等しい。

摘　　要

昭和 35 年 5 月に日光中禅寺湖でとれた天然ニジマスについて，肝，腎，幽門垂，腹腔内脂肪，頭部および可食部よりそれぞれ脂質を抽出し，不鹸化物および混合脂肪酸の分析を行なつた。さらに脊肉については，頚部，中央部，尾部の3部分から脂質を抽出し，比較検討した。

本研究にあたり，大日の恒氣，並服をして頂いた水産庁調査船漁場の諸氏，なみに本論文作製等なる御指導を賜わった東京都部長，平尾ロタミン科長に謝えて感謝の意を表します。

文　　献

1) 辻本満丸：東工試，**12**，178 (1917).
2) 小野豊樹・永山文男：J. Tokyo Univ. Fish. **45**，153 (1959).
3) 須山三千三・荻野珍吉：本誌，**23**，786 (1958).
4) 秋谷年見：食研報，**12**，76 (1957).
5) R. T. HOLMAN and H. HAYES：Anal. Chem. **30**，1423 (1958).
6) 深山義道・長谷川漸成・石川福助：本誌，**8**，220 (1940).
7) 外山修之：東工誌，**20**，86 (1925).
8) 東　秀雄・新間弥一郎・田口脩子：本誌，**26**，411 (1960).
9) 平尾秀一・山田充阿弥・菊地　嶺：本誌，**19**，1049 (1954).
10) 高橋豊雄：東海水研報，**30**，95 (1961).
11) 金光庸俊・青江　弘：本誌，**24**，555 (1958).
12) 平尾秀一：未発表.

γ) 数代にわたる相加蓄積作用の可能性—Strong によるメチルコランスレンの実験（1935年）および Wirth によるマラカイドグリーンの実験（1958年）—を見るため，ラットかマウスのような短命な種類を使って，少なくとも二世代について投与実験を行うこと．

ウレタンやメチルコランスレンを妊娠動物に与えると，それらの物質は乳汁に現われたり，胎盤を経て胎児に移行し，出生児にがんを発生したので，実際問題として妊娠動物やその子供に及ぼす影響も検討しなければならないことである．

1）**コントロール**： コントロールのための動物数は，少なくとも処置動物と同じでなければならない．なおネガティブコントロールには，処置動物に与えたと全く同じ飼料を与え，試料を皮下注射したときは，その溶媒を注射しなければならない．さらに望ましいことは，別にポジティブコントロールを用意して，この群には処置動物と同一条件のもとで，試料と化学的に関連性のある発がん物質を投与するのである．これはアゾ色素の試験のとき，バターイエローを用いるようなものであるが，しかし関連発がん物質を選ぶということは，なかなか困難なことと想像する．

II. 実験結果の解釈

この場合は，「人類を慢性毒性危害より守るヨーロッパ研究委員会」と1956年夏ローマで開かれたUICCのシンポジアムとで，いずれも採択された決議の中の一般的原則を思い起すことが有効であるが，その詳細は割愛することにしたい．

（筆者注： 上記ローマにおける決議内容は，本誌に掲載する予定であるが，これは発がん性物質の動物試験法の一般，実験所見の解釈などを掲げ，さらに各論として重要な添加物数種類をとりあげ，それぞれに属する一般的化合物を毒性の高低によって区分してあるので，食品衛生関係者には，大きな示唆となるものと信ずる）．

ホウ酸の水産ねり製品への不正使用状況について[*1]

内山 均[*2] 天野 慶之[*2]

Examination of Boric Acid Illegally Added to Fish Jelly Products

Hitoshi UCHIYAMA, Keishi AMANO
(from the Tokai Regional Fisheres Research Laboratory)

167 Samples of Kamaboko (fish jelly product) and related products were collected in 1958 season, from the places of production covering areas; Sendai, Niigata, Takaoka, Okayama, Hiroshima, Yamaguchi, Yahatahama, Kochi, and Kannonji, and examined as to the illegal use of boric acid as food preservative. The addition of boric acid was positively proved for 22 samples processed in three different districts including Yamaguchi, Kochi and Kannonji and not for the rest of places. A strikingly large amount of boric acid, more than 3 g per 100 g of the product was observed in a Kamaboko, purchased from a place of Yamaguchi.

This might be caused by a difficulty to make even distribution of the compound in raw fish jelly. Though the area of illegal use of boric acid seems to be confined within three prefectures, more strict control should be intensified, in order to establish wholesomeness of the product, which posesses the most important part in the fisheries products.

(Received December 22, 1960)

*1 東海区水産研究所業績B. 345

*2 東海区水産研究所

いうまでもなく，ホウ酸の食品添加物としての使用は，許可されていない．ところが，一部の水産ねり製品には，夏期製品の防腐対策としてホウ酸が加えられているときいている．また実際に，著者らは，二，三の保健所が検査した結果もみているのであるが，この使用状況についての明確な報告は，まだ見当らないようである．このことを食品衛生的にみた場合，本化合物の使用は，きわめて問題であり，もしこれが広く一般に用いられているとすれば，強い規制も必要としなければならない．以上のような点から，著者らは，あらためてねり製品へのホウ酸の使用状況についての検討を行なったので，その結果を報告する．

実験方法

1. 試料　試料は195 年7～9 月に集めた．すべて実際に市販されていたもので，購入場所，製品名を記載し，ポリエチレンの袋にいれて運んだ．できるだけ各地の製品を集めたいと考えたが，入手方法の都合で，仙台，新潟，高岡，岡山，広島，山口県下，八幡浜，高知および観音寺（香川県）に限定せざるを得なかった．このように各地で採集した試料は，ポリエチレン袋のまま凍結し，逐次，実験に供した．その総数は167点である．

2. 分析方法　試料採取量および定性，定量試験は，食品衛生検査指針[1]によった．クルクマ試験紙による定性で，明確な暗青緑色の反応を示すものを，ホウ酸陽性とし，この反応を示さないものは陰性とした．そして反応陰性なものは，定量試験を省略した．

実験結果

第1表に，その測定結果を示す．すなわち，山口，高知および香川県下の採集製品の一部からは，明らかにホウ酸が検出されるのである，同一地区のもので，多いものでは，3%以上，少ない場合は，0.5%以下の添加量となっているが，これはホウ酸を添加する際，粉末として加えるので，溶けにくく，すり身に均一に混和されないためではないかと思われる．いずれにしても，実際に市販されている製品に，このような不許可化合物が，夏期ねり製品の防腐に用いられていることは明らかなのである．

以上の3地区の検出割合を集計すると，第2表に示すとおりである．すなわち，山口と香川県下の場合では，採取試料の34%に，ホウ酸が検出されたことになる．以上の3地区とならんで，前記各地区の塩釜（検体数14），

第1表　市販のねり製品から検出されるホウ酸

No.	産地	品名	定性試験	ホウ酸 g%
1	防府	板付カマボコ	−	／
2	徳山	焼抜カマボコ	−	／
3	〃	板付カマボコ	−	／
4	山口	〃	+	3.9
5	〃	つと巻	+	0.3
6	仙崎	板付カマボコ	−	／
7	〃	〃	−	／
8	長門	〃	−	／
9	仙崎	〃	+	0.9
10	長門	〃	+	0.3
11	仙崎	つと巻	−	／
12	長門	焼抜カマボコ	+	0.1
13	〃	魚肉ソーセージ型カマボコ	+	1.0
14	正明	板付カマボコ	−	／
15	〃	つと巻	−	／
16	長門	魚肉ソーセージ型カマボコ	+	1.0
17	正明	板付カマボコ	−	／
18	〃	つと巻	−	／
19	〃	板付カマボコ	−	／
20	〃	つと巻	−	／
21	仙崎	板付カマボコ	−	／
22	萩	〃	+	0.5
23	〃	〃	−	／
24	〃	〃	−	／
25	〃	〃	−	／
26	〃	焼抜カマボコ	+	0.4
27	〃	板付カマボコ	−	／
28	〃	〃	−	／
29	〃	〃	+	2.0
30	高知	板付カマボコ	−	／
31	〃	〃	−	／
32	〃	〃	±	?
33	〃	〃	−	／
34	〃	〃	−	／
35	〃	〃	−	／
36	〃	〃	±	?

37	高知	板付カマボコ	−	／
38	〃	〃	−	／
39	〃	〃	−	／
40	〃	〃	−	／
41	〃	〃	±	?
42	〃	〃	−	／
43	〃	〃	−	／
44	〃	〃	−	／
45	〃	〃	−	／
46	〃	〃	−	／
47	〃	チクワ	±	?
48	〃	板付カマボコ	−	／
49	〃	〃	−	／
50	〃	〃	−	／
51	〃	〃	−	／
52	〃	揚げもの	−	／
53	〃	すまき	−	／
54	〃	〃	−	／
55	〃	〃	−	／
56	〃	〃	−	／
57	〃	〃	−	／
58	〃	〃	−	／
59	観音寺	揚げもの	+	0.4
60	〃	〃	−	／
61	〃	〃	+	0.4
62	〃	〃	−	／
63	〃	〃	+	0.7
64	〃	〃	−	／
65	〃	〃	+	0.3
66	〃	〃	+	0.3
67	〃	〃	+	0.2
68	〃	〃	−	／
69	〃	〃	−	／
70	〃	〃	−	／
71	〃	ソーセージ型カマボコ	+	0.5
72	〃	〃	−	／
73	〃	〃	+	0.4
74	〃	〃	+	0.3
75	〃	板付カマボコ	−	／
76	〃	〃	−	／
77	観音寺	板付カマボコ	−	／
78	〃	〃	−	／
79	〃	〃	−	／
80	〃	〃	−	／
81	〃	〃	−	／
82	〃	〃	−	／
83	〃	〃	−	／
84	〃	〃	−	／

第2表 山口，高知および観音寺地区のねり製品から検出されるホウ酸

地区	検数	検出数	%
山口	29	10	34.4
高知	29	4	13.7
観音寺	26	9	34.4

新潟(検体数18)，岡山(検体数11)，八幡浜（検体数23)，広島（検体数13)，高岡(検体数4）について，同様の検査を行なったが，ホウ酸の検出されたものは皆無であった．すなわち，ホウ酸使用を全国的にみると，この調査の範囲では，1地区に限定されているといえる．なおホウ酸が検出されなかった地区の採取試料には，各種のねり製品があったが，その記載は省略する．

考察

周知のように，水産ねり製品は水産加工食品の中で最も生産量が多い．最近の統計では，年間46万トンの生産をあげている．ところが，これらの生産は，手工業的な規模で造られており，これらが全国いたるところに散在している．そしてねり製品は，水分含量[2]が75～80%であり，また副原料であるデンプン[3,4]，特にバレイショデンプンには，細菌汚染がはなはだしい関係もあって，きわめて変敗しやすいという欠点がある．しかも，その防腐法は，この企業の性格上，最も簡易なものが要望されている．この点，防腐剤のような，単に添加すれば足りる方法は，ねり製品の防腐には適したものといい得る．

現在ねり製品にその添加が許可されている防腐剤は，ニトロフラゾーン（別名フラスキン）およびソルビン酸の2種であるが，両化合物とも，魚肉ソーセージ以外のねり製品の防腐には，顕著な効果を望むことはできないのである．それに対する理論的な解析も，今井(1959)[5]，岡（1956)[6]，Bell(1959)[7]により明らかにされている．

ホウ酸のねり製品への使用は，以上のニトロフラゾー

ンおよびソルビン酸では充分な防腐目的を達し得ないという，一部業者のやむにやまれぬ要望からでた，違法行為と思われるが，どんな理由にせよ，これを肯定することはできない．それは以下の理由による．

これまでホウ酸の毒性については，消化液分泌および消化酵素作用阻害[8]，あるいは匹当り1～3g中毒，8～17g致死程度の記載[9]があるくらいであるが，Sciarra (1958)[10]は，ホウ酸による中毒の総説を書き，ホウ酸は消化管から急速に吸収され，体内に蓄積されると述べている．そして，アメリカでの多くの中毒例を引例して，ホウ酸中毒で死亡した幼児を解剖した結果では，脳，肝臓，腎臓，心臓，胸腺，筋肉および血液にホウ酸が検出されたとしている．口経的中毒の一般的徴候は，腹痛，下痢，嘔吐，脈搏結滞，蒼白などをあげている．ホウ酸は一般には，外用薬として軟膏に用いているが，外傷がひどく，筋肉が露出していると，この部分からホウ酸が吸収され，幼児の発疹の治療に用いて死亡した例を多くあげている．したがって，アメリカの皮膚科医では，傷の程度によっては，多量のホウ酸を塗布することは危険だとしている．以上のような理由によって，食品としての水産ねり製品に，ホウ酸を添加することは，きわめて危険であり，その禁止については強い規制をすべきである．

要　約

水産ねり製品へのホウ酸の使用状況を，1958年夏期の市販品について検査した．採取地区は，仙台，新潟，高岡，岡山，広島，山口県下，八幡浜，高知および観音寺地区である．採取数は167点である．試験の結果，山口，高知県下および観音寺地区の一部の製品には，明らかにホウ酸の添加が認められた．顕著な例では，3％以上にもおよぶものがあった．おそらく，ホウ酸末として加えるので，均一にすり身に混和されない結果とみられる．しかし，以上の3地区以外の製品からは，全たく検出されなかった．すなわち，この調査の範囲では，全国的にみた場合，ホウ酸の使用は1地区に限定されているといえる．しかしホウ酸は，消化管からすみやかに吸収され，中毒の原因となることが明らかにされているから，これのねり製品への使用は，強い規制によって禁止すべきである．

終りに，試料の採取について，多大の御協力を得た，尾藤方通夫妻，荒川清，梅本滋，佃信夫の方々に厚くお礼申し上げるしだいである．

文　献

1）厚生省刊：食品衛生検査指針 p. 332 (1951).
2）岡田　稔：東海区水産研究所報告 **13**, 85(1956).
3）木俣正夫：日本水産学会誌 **16**, (12) 55 (1951).
4）鈴木繁男：殿粉工業雑誌 **6**, 3～4併号 121(1959).
5）今井　寛：農産加工技術研究会，第6回大会シンポジウム食品添加物 p. 30 (1959).
6）岡　智：醗酵工業雑誌 **36**, 502 (1956).
7）T. A. Bell：J. of Bacteriol **77**, 573 (1959).
8）柳沢文徳："食品衛生" p. 74 (1953)，共立出版（東京）.
9）池田良雄："薬物致死量集" p. 184(1953)，南山堂（東京）.
10）J. J. Sciarra：J. Am. Pharm. Assoc. **19**, 494 (1958).（内山均訳　水産科学 **8**, 26 1960）.

食品衛生法に関する資料

食品添加物に関する改正概要（昭和35年1～12月）

I．食品添加物公定書[1]公布（昭和35年3月15日）

昭和32年6月法律第175号（第9次改正）によって，食品衛生法の一部が改正され，同法第13条に「食品添加物公定書」に関する規定が新しく設けられてから，3年目に当る昭和35年3月15日付をもって，世界各国に例をみない「食品添加物公定書」が公布された．

本公定書は食品衛生法第7条の規定に基づいて，基準や規格の定められた添加物および同法第11条の規定に基づいて，その基準および規格が収載された公定書である．

まず，同法第7条では「厚生大臣は公衆衛生の見地から，食品や添加物の基準および規格を定めることができ